

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**Identificación de genotipos y linajes de los cuatro  
serotipos del virus dengue en el Perú durante los años  
1998 - 2012**

**TESIS**

**Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas**

**AUTOR**

**Enrique Walter Mamani Zapana**

**ASESOR**

**Egma Marcelina Mayta Huatuco**

**Lima – Perú**

**2013**

Asesora: Dra. Egma Marcelina Mayta Huatuco

## **Maldito Mosquito Dengue**

Llegue a compararte  
al flagelo de la gripe,  
pero ahora me doy cuenta.  
Eres un mosquito simplemente.

Desaloje los estanques,  
los floreros y lavarropas  
y seguís apareciendo.  
¡Maldito dengue opa!

Te criaron en el nordeste  
parajes donde incomodaste.  
Ahora en los suburbios moras,  
picando y zumbando al garete.  
Relente, off, cidronela,  
montañas de pasto quemo  
y seguís apareciendo.  
¡Maldito mosquito dengue!

Tu zumbido lascivo fastidia.  
No te callare con murallas,  
ni con piedras, ni con ladrillos.  
Tengo envuelta la vida  
en tules y repelente, y digo...  
No molestes más, esta vez.  
¡Estoy armada hasta los dientes!

Mónica Alejandra

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Egma Mayta Huatuco, quien ha contribuido en el asesoramiento de la presente tesis desde el inicio hasta la culminación de la misma.

Mi agradecimiento para Paquita García Mendoza, Coordinadora del Laboratorio de Metaxénicas Virales, quien contribuyó con los aspectos técnicos administrativos para el desarrollo de la tesis.

Al Instituto Nacional de Salud, Organismo Público Ejecutor del Ministerio de Salud dedicado a la investigación de los problemas prioritarios de salud y de desarrollo tecnológico, en donde se me ha permitido utilizar la infraestructura y equipamiento necesarios.

A los compañeros de trabajo del Laboratorio de Metaxénicas Virales del CNSP – INS: Dina Torres, Dana Figueroa, Tomas Paredes, Susy Merino y Victoria Gutiérrez, quienes de una u otra forma facilitaron el desarrollo de los procedimientos realizados.

Al personal del Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del CNSP – INS, por el apoyo con los equipos de electroforesis y secuenciación.

A mis amigos del Instituto Carlos III de España: Antonio Tenorio y Leticia Franco por su contribución científica y por permitir realizar mi entrenamiento en análisis de secuencias en sus instalaciones.

## **DEDICATORIAS**

A mi padre Fortunato,  
quién me sigue mostrando el deseo de hacer bien las cosas cada día.

A mi madre Marcelina,  
quién permanentemente me contagia con su alegría y entusiasmo.

A mi hija Julisa,  
quién es una inspiración y motivo constante en mi vida.

A mis hermanos, Braulio, Armando, Guido, Harold, Belisario, Carolina y Priscila  
que a pesar de las distancias aún podemos disfrutar de los triunfos y alegrías de  
todos.

## CONTENIDO

	<i>Pág.</i>
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS .....	xi
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. La enfermedad del dengue.....	3
2.2. El virus dengue.....	13
2.3. Genotipos del DENV.....	20
2.4. Estudios previos.....	24
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
4.1. Identificación de los serotipos en las cepas de los virus dengue mediante RT-PCR que amplifica el gen C.....	32
4.1.1. Muestra.....	32
4.1.2. Extracción de RNA mediante el uso del <i>Qiaamp viral RNA kit</i> .....	33
4.1.3. RT-PCR múltiple de un fragmento del gen Cápside.....	34
4.2. Identificación de los genotipos y linajes para los cuatro serotipos del DENV mediante secuenciación y análisis filogenético de la unión de los genes E/NS1.....	35
4.2.1. RT-Nested PCR para amplificación de los genes E/NS1.....	35
4.2.2. Purificación del DNA de los productos obtenidos por RT – PCR mediante <i>QIAquick PCR Purification kit</i> .....	36
4.2.3. Purificación de DNA para secuenciación.....	38
4.2.4. Secuenciación genética.....	38
4.2.5. Análisis filogenético.....	39

4.3. Secuenciación y análisis filogenético del genoma completo de la cepa 121776510, DENV-2, genotipo América/Asia.....	39
4.4. Análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del fragmento E/NS1 de los cuatro serotipos del DENV.....	40
4.5. Distribución de los genotipos y linajes del DENV según la región geográfica y año de aislamiento.....	41
V. RESULTADOS.....	41
5.1. Identificación de los serotipos en las cepas de los virus dengue Para el gen C.....	41
5.2. Identificación de los genotipos y linajes para los cuatro serotipos del DENV mediante secuenciación y análisis filogenético de la unión de los genes E/NS1.....	41
5.2.1. Identificación de genotipos y linajes del DENV-1.....	43
5.2.2. Identificación de genotipos y linajes del DENV-2.....	46
5.2.3. Identificación de genotipos y linajes del DENV-3.....	48
5.2.4. Identificación de genotipos y linajes del DENV-4.....	50
5.3. Secuenciación y análisis filogenético del genoma completo de la cepa 121776510, DENV-2, genotipo América/Asia.....	52
5.4. Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de los fragmentos E/NS1 para los cuatro serotipos del DENV.....	54
5.4.1. Análisis nucleotídico y aminoacídico de los fragmentos E/NS1 del DENV-1.....	54
5.4.2. Análisis nucleotídico y aminoacídico de los fragmentos E/NS1 del DENV-2.....	55
5.4.3. Análisis nucleotídico y aminoacídico de los fragmentos E/NS1 del DENV-3.....	57
5.4.4. Análisis nucleotídico y aminoacídico de los fragmentos E/NS1 del DENV-4.....	60
5.5. Distribución de los genotipos y linajes del DENV según la región geográfica y año de aislamiento.....	61

VI. DISCUSIÓN.....	64
6.1. Identificación los genotipos y linajes para los cuatro serotipos del DENV mediante secuenciación y análisis filogenético de la unión de los genes E/NS1.....	65
6.1.1. Genotipos y linajes del DENV-1.....	65
6.1.2. Genotipos y linajes del DENV-2.....	66
6.1.3. Genotipos y linajes del DENV-3.....	67
6.1.4. Genotipos y linajes del DENV-4.....	69
6.2. Análisis filogenético del genoma completo de la cepa 1217776510, DENV-2, genotipo América/Asia.....	70
6.3. Análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.....	70
6.4. Distribución de los genotipos y linajes de los virus dengue según la región geográfica y año de aislamiento.....	71
VII. CONCLUSIONES.....	73
VIII. RECOMENDACIONES.....	74
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
X. ANEXOS.....	88



## LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1. Distribución mundial del dengue y áreas de riesgo, 2010.....	5
Figura 2. Promedio anual de casos de fiebre por dengue (DF) y dengue hemorrágico (DHF) reportados a OMS y reporte de casos de dengue de países, 1955–2007 (WHO, 2009).....	6
Figura 3. Clasificación de casos de dengue sugerida y niveles de gravedad (WHO, 2009).....	8
Figura 4. Transmisión de los virus dengue (Whitehead <i>et al.</i> , 2007).....	10
Figura 5. Áreas de riesgo para dengue. Las líneas definen el área donde puede sobrevivir el mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Adaptado de OMS).....	11
Figura 6. Partícula viral del DENV y sus principales componentes (Barth M., 2000).....	14
Figura 7. Estructura del virión de DENV y conformación de la proteína E. ER: retículo endoplasmático; TGN: Red trans-Golgi; prM: precursor de membrana (Perera <i>et al.</i> , 2008).....	15
Figura 8. Ciclo de replicación del virus dengue.....	16
Figura 9. Organización del genoma del virus dengue (arriba) y topología de la membrana y sitios de clivaje proteolítico de la poliproteína transcrita. (Perera y Kuhn, 2008).....	17
Figura 10. Factores que contribuyen a la diversidad genética del virus dengue y dos consecuencias evolutivas posibles (Holmes and Burch, 2000).....	18
Figura 11. Árbol filogenético no enraizado ( <i>Minimum Evolution</i> ) para el gen E de 554 flavivirus.....	19
Figura 12. Tasa de incidencia acumulada de dengue y serotipos. Perú 1990-2011.....	30

Figura 13. Distribución de los serotipos del virus dengue que han sido incluidos en el estudio, se indica cuáles de los serotipos han sido incluidos por cada región endémica para dengue en Perú.....	33
Figura 14. Flujograma para la identificación de los genotipos y linajes del DENV y el análisis filogenético de la unión de los genes E/NS1.....	97
Figura 15. Identificación de los serotipos en las cepas de los virus dengue mediante RT-PCR que amplifica el gen C.....	41
Figura 16. Productos de amplificación de 328 pb del fragmento E/NS1 de los cuatro serotipos del virus dengue mediante RT - Nested PCR.....	42
Figura 17. Productos de amplificación de 328 pb del fragmento E/NS1 purificados mediante columna correspondiente a los cuatro serotipos del virus dengue.....	42
Figura 18. Secuencia consenso obtenida en una muestra analizada mediante el programa <i>SeqMan</i> .....	43
Figura 19. Árbol filogenético del DENV-1 obtenido mediante el algoritmo de distancia <i>Neighbor-Joining</i> con valor <i>bootstrap</i> de 1000 autorélicas.....	45
Figura 20. Árbol filogenético del DENV-2 obtenido mediante el algoritmo de <i>Neighbor-Joining</i> con valor <i>bootstrap</i> de 1000 autorélicas.....	47
Figura 21. Árbol filogenético del DENV-3 obtenido mediante el algoritmo de <i>Neighbor-Joining</i> con valor <i>bootstrap</i> de 1000 autorélicas.....	49
Figura 22. Árbol filogenético del DENV-4 obtenido mediante el algoritmo de <i>Neighbor-Joining</i> con valor <i>bootstrap</i> de 1000 autorélicas.....	51
Figura 23. Árbol filogenético del DENV-2 obtenido mediante el método <i>Maximum Likelihood</i> con valor <i>bootstrap</i> de 1000 autorélicas...	53

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Funciones de las proteínas no estructurales del virus dengue (Perera <i>et al.</i> , 2008).....	16
Tabla 2. Clasificación de Genotipos del DENV-1 de acuerdo a Goncalvez <i>et al.</i> , (2001).....	20
Tabla 3. Clasificación de Genotipos del DENV-2 de acuerdo a Twiddy <i>et al.</i> , (2002).....	22
Tabla 4. Clasificación de genotipos de DENV-3 de acuerdo a Lanciotti <i>et al.</i> , (1994).....	23
Tabla 5. Clasificación de genotipos DENV-4 y su distribución en el mundo.....	24
Tabla 6. Relación de materiales de laboratorio empleado en el estudio...	88
Tabla 7. Relación de equipos de laboratorio empleado en el estudio.....	89
Tabla 8. Relación de las 20 cepas de DENV-1 incluidas en el estudio según área geográfica y año de aislamiento en Perú.....	89
Tabla 9. Relación de las cepas 27 de DENV-2 incluidas en el estudio según área geográfica y año de aislamiento en Perú.....	90
Tabla 10. Relación de las 52 cepas de DENV-3 incluidas en el estudio según área geográfica y año de aislamiento en Perú.....	91
Tabla 11. Relación de las 10 cepas de DENV-4 incluidas en el estudio según área geográfica y año de aislamiento EN Perú.....	92
Tabla 12. Primers utilizados para realizar la RT-PCR y Nested PCR para amplificar y secuenciar la región E/NS1 de los cuatro serotipos del virus dengue.....	93
Tabla 13. Preparación de la mezcla maestra para la reacción de secuenciación con el <i>kit BigDye terminator v. 3.1</i> .....	94
Tabla 14. Lista de las secuencias de DENV-1 obtenidas de los bancos genéticos e incluidas en el estudio.....	94

Tabla 15. Lista de las secuencias de DENV-2 obtenidas de los bancos genéticos e incluidas en el estudio.....	95
Tabla 16. Lista de las secuencias de DENV-3 obtenidas de los bancos genéticos e incluidas en el estudio.....	95
Tabla 17. Lista de las secuencias de DENV-4 obtenidas de los bancos genéticos e incluidas en el estudio.....	96
Tabla 18. Comparación de sitios variables de las secuencias aminoacídicas de la cepa 121776510, DENV-2 y cepa de Brasil BID-V3637. ....	52
Tabla 19. Comparación de los sitios variables de las secuencias nucleotídicas del fragmento E/NS1 del DENV-1, posiciones 5 a 194.....	54
Tabla 20. Comparación de sitios variables de las secuencias aminoacídicas del fragmento E/NS1 del DENV-1, posiciones 3 a 65.....	55
Tabla 21. Comparación de los sitios variables de las secuencias nucleotídicas del fragmento E/NS1 del DENV-2, posiciones 11 a 212.....	56
Tabla 22. Comparación de sitios variables de las secuencias aminoacídicas del fragmento E/NS1 del DENV-2, posiciones 4 a 71.....	57
Tabla 23. Comparación de sitios variables de las secuencias nucleotídicas del fragmento E/NS1 del DENV-3, posiciones 2 a 215.....	58
Tabla 24. Comparación de sitios variables de las secuencias aminoacídicas del fragmento E/NS1 del DENV-3, posiciones 1 a 70.....	59
Tabla 25. Comparación de sitios variables de las secuencias nucleotídicas del fragmento E/NS1 del DENV-4, posiciones 77 a 218.....	60

Tabla 26. Comparación de sitios variables de las secuencias aminoacídicas del fragmento E/NS1 del DENV-4, posiciones 26 a 73.....	60
Tabla 27. Distribución de los genotipos y linajes del DENV-1 según región geográfica y año de aislamiento.....	61
Tabla 28. Distribución de los genotipos y linajes del DENV-2 según región geográfica y año de aislamiento.....	62
Tabla 29. Distribución de los genotipos y linajes del DENV-3 según región geográfica y año de aislamiento.....	62
Tabla 30. Distribución de los genotipos y linajes del DENV-4 según región geográfica y año de aislamiento.....	63

## ABREVIATURAS

**aa:** aminoácido

**bp:** pares de bases

**CDC:** Centro para el control de enfermedades

**CHIKV:** virus Chikungunya

**DC:** dengue clásico

**DENV:** virus dengue

**DF:** fiebre del dengue

**DH:** dengue hemorrágico

**DHF:** fiebre hemorrágica del dengue

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DNAc:** ácido desoxirribonucleico complementario

**E/NS1:** unión de los genes de envoltura y NS1 del virus dengue

**E:** gen de envoltura

**MEGA:** análisis genético de evolución molecular

**NS:** proteínas no estructurales

**OMS/WHO:** Organización Mundial de la Salud

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**RNA:** ácido ribonucleico

**RT- Nested PCR:** Transcripción inversa – reacción de cadena de la Polimerasa  
anidada

**RT-PCR:** Transcripción inversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa

**SCD:** síndrome de choque por dengue

**SCD:** Síndrome de choque por dengue

## RESUMEN

El dengue es una enfermedad febril aguda viral causada por la infección con uno de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1, 2, 3 y 4) que se transmite al hombre a través del mosquito del género *Aedes aegypti*. En el presente estudio se identificaron los genotipos y linajes de los cuatro serotipos del virus dengue a partir de los aislamientos obtenidos en muestras procedentes de diferentes regiones geográficas de Perú durante los años 1998 - 2012.

El diseño del estudio fue descriptivo - retrospectivo de las características genéticas, 109 cepas que pertenecen a uno de los cuatro serotipos del virus dengue fueron procesadas por la RT-Nested PCR para amplificar la región del gen E/NS1 y se secuenció el genoma completo de una cepa de DENV-2. Las secuencias fueron alineadas con el programa CLUSTAL X y analizadas con el programa MEGA 5.0 con el algoritmo de distancia *Neighbor Joining* para E/NS1 y el método de *Maximum Likelihood* para el genoma completo.

Se identificó el serotipo DENV-1, genotipo V, con tres linajes; respecto al serotipo DENV-2, se estableció dos genotipos: el genotipo América con dos linajes y genotipo América/Asia con cinco linajes. El serotipo DENV-3, presentó el genotipo III con cinco linajes y finalmente se halló el serotipo DENV-4 con dos linajes.

Se concluye que los cuatro serotipos de los virus dengue aislados en diferentes áreas geográficas de Perú durante los años 1998 - 2012 presentaron variabilidad genética a nivel de genotipos y linajes, siendo el DENV-3 más divergente con cinco linajes y el DENV-4 menos divergente con dos linajes, respecto a los otros serotipos estudiados.

**Palabras clave:** *virus dengue, serotipo s virus dengue, genotipo viral, linaje viral, genoma viral*

## ABSTRACT

Dengue is an acute febrile viral disease caused by infection with one of the four dengue virus serotypes (DENV-1, 2, 3 and 4) that is transmitted to humans by the mosquito *Aedes aegypti*. In the present study identified genotypes and line ages of the four dengue virus serotypes from isolates from different geographic regions of Peru from 1998 - 2012.

Design of the study was descriptive – retrospective of the genetic features, 109 strains belonging to one of the four dengue virus serotypes were processed by RT-Nested PCR to amplify the gene region E/NS1 and sequenced the full genome of a strain of DENV-2. Sequences were aligned with the program CLUSTAL X and analyzed with the software MEGA 5.0 with the Neighbor-Joining distance algorithm for E/NS1 and Maximum Likelihood method for full genome.

Was identified serotype DENV-1, genotype V, with three lineages; respect to serotype DENV-2, were described two genotypes: genotype America with two lineages and genotype Americas/Asia with five lineages. DENV-3 genotype III presented the five lineages and ultimately was found DENV-4 with two lineages.

We conclude that the four serotypes of dengue viruses isolated in different geographical areas of Peru during 1998 - 2012 showed genetic variation at the level of genotypes and lineages, DENV-3 remains the most divergent with five lineages and least divergent DENV-4 with two lineages, compared to the other serotypes examined.

**Keywords:** dengue virus, dengue virus serotype, viral genotype, viral lineage, viral genome.



## I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha aumentado considerablemente la incidencia de dengue en el mundo. Dos mil quinientos millones de personas —más del 40% de la población mundial están en riesgo de contraer el dengue. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año se produce entre 50 millones y 100 millones de infecciones por el virus del dengue en el mundo. Cada año, unas 500 000 personas que padecen dengue grave —niños en una gran proporción— necesitan hospitalización. Aproximadamente un 2,5% fallecen (OMS, 2012).

En el Perú, los primeros casos de dengue epidémico fueron reportados en la Amazonía (Iquitos, Pucallpa y Tarapoto) en 1990 (7 858 casos en total), aislándose el virus dengue serotipo 1 (DENV-1) (Phillips, 1993). Luego, el dengue se ha extendido en el país desde el Oriente hacia el Occidente y de Norte a Sur. En 1991, se notificaron epidemias en Tingo María y Chanchamayo; en 1992, en Tumbes; y en 1993, en Piura. En 1995 se presentó el primer reporte del virus dengue 2 (DENV-2) en nuestro país durante un brote ocurrido en Iquitos y Pucallpa y en tres ciudades de la Costa Norte: Tumbes, Máncora y Los Órganos (Watts *et al.*, 1998), los resultados del análisis filogenético de las secuencias del DNA del DENV-2 mostraron que las cepas pertenecían al genotipo americano y diferían de las cepas del sudeste asiático (Porter *et al.*, 1997).

Para el año 2001 los cuatro serotipos del virus dengue (DENV) estaban circulando en el Noroeste de Perú, así como en otras regiones tropicales, se informó de miles de casos de DC (dengue clásico) y casos de DH/SCD (dengue hemorrágico /síndrome de choque por dengue), se aisló los cuatro serotipos del virus dengue y determinó la circulación de dos genotipos del DENV-2: genotipo americano y genotipo asiático en la costa Norte (Montoya *et al.*, 2003).

La presente tesis busca identificar en un grupo de cepas, los genotipos de los cuatro serotipos del DENV que circularon en diferentes áreas geográficas en

el Perú de 1998 a 2012 mediante la secuenciación y análisis genético de un fragmento de la unión del gen de Envoltura (E) y el gen No Estructural 1 (NS1).

Finalmente, esta tesis contribuye en el conocimiento de los genotipos y linajes del DENV y su distribución en las diferentes áreas geográficas en un periodo de 14 años resaltando la importancia de la vigilancia molecular del DENV que permita la identificación de cepas que pueden estar asociadas a gravedad de la enfermedad y brinde información oportuna para la toma de decisiones a las autoridades en las actividades de prevención y control del dengue en el país.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1. La enfermedad del dengue**

#### **a) Definición**

El dengue es una enfermedad febril aguda viral causada por la infección con uno de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1, 2, 3 y 4) que se transmite al hombre a través del mosquito del género *Aedes*, provocando una enfermedad con un amplio espectro de formas clínicas que va desde una fiebre indiferenciada hasta las formas más graves con hemorragia y síndrome de choque (Gubler, 1998).

#### **b) Etimología**

Fueron varios los nombres asociados a esta enfermedad de acuerdo a la región geográfica; se denominó “La Piadosa” en Cádiz, España (1784-86); “Dengue” en España (1809); Ki Dinga Pepo, Denga en Zanzíbar, África del Este (1823); “Ephemeral fever” en Calcutta, la India (1824); “Dandy fever” Santo Tomas, Islas Virginias (1827); “Dunga, Dengue” en Cuba, 1828; “Polka fever” en Brasil, (1845-49); “Three-day or seven-day fever” en la India, 1909; “Ban-’Sha” en Taiwan, 1916 y “Five-day fever” Indonesia (1960s). A partir de la década de los años cincuenta se denominó fiebre del dengue (FD) a la forma clásica y fiebre hemorrágica del dengue / síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) a la forma severa de la enfermedad (Gubler, 1997).

#### **c) Historia**

La primera descripción de una enfermedad compatible con dengue se publicó en la Enciclopedia China en el año 992 de nuestra era. Sin embargo, no fue hasta 1635 que en las Indias Francesas del Oeste se conoció un reporte similar, donde la enfermedad fue denominada “Coup de Barre” y en Panamá en 1699 (Gubler, 1997). En 1779, en Batavia, Indonesia se reportó una epidemia de casos febriles denominada “Knockelkoorts” (fiebre de huesos) y en el mismo año en el Cairo, Egipto se le denominó “Mal de Genoux” (problemas de rodilla). En 1780 en Filadelfia, EUA se reportó la enfermedad febril como “escarlatina reumática”, en España en 1748-88, en Perú 1818, India 1836, Bermuda 1837,

en Texas y Florida 1850-51, Taiwán 1889-90 y Australia 1996-99 (Gubler, 1997).

La ocurrencia casi simultánea de epidemias en Asia, África, y América del Norte indicó una distribución mundial de estos virus y su vector. En sus inicios, se consideró una enfermedad benigna de los visitantes a los trópicos. Las epidemias se producían a intervalos de 10-40 años, principalmente porque los virus y su vector transmisor sólo podían transportarse entre los centros de la población a través de la navegación (Gubler, 1997).

Los estudios de la enfermedad comenzaron con la demostración por Graham en 1903 (Graham, 1903) de la capacidad de los mosquitos para transmitir el dengue. El virus dengue se aisló por primera vez en Hawái en 1944, al que se denominó DENV-1 y en el mismo año se aisló en Nueva Guinea otra cepa relacionada antigénicamente a la que se denominó DENV-2 (Sabin, 1950; Sabin, 1952).

En Manila, se aislaron los serotipos 3 y 4 a partir de muestras clínicas de pacientes con un cuadro de dengue hemorrágico en 1956 y 1960 (Hammon, 1960).

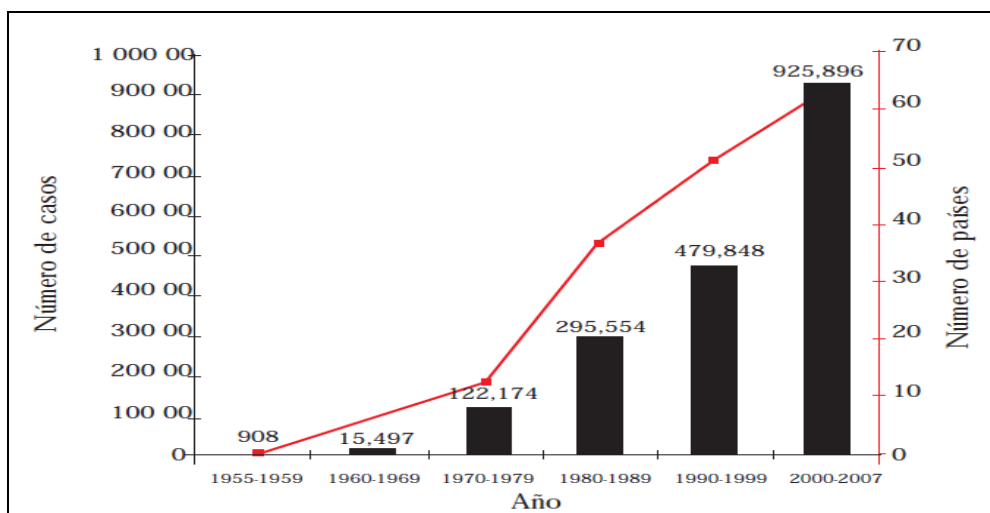
#### **d) Epidemiología**

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos de mayor propagación en el mundo (Figura 1). En los últimos 50 años, la incidencia se ha incrementado 30 veces con la expansión geográfica a nuevos países, en la presente década se ha visto la propagación desde las ciudades hacia el área rural. Se estima que ocurren 50 millones de casos cada año (Figura 2) y cerca de 2,5 millones de personas viven en países con dengue endémico (WHO, 2008).



**Figura 1.** Distribución mundial del dengue y áreas de riesgo (OMS, 2010).

La Resolución WHA55.17 (WHO, 2002) de la OMS del año 2002 instó a los países miembros a un mayor compromiso con el dengue. De particular significado es la resolución WHA58.3 de la Asamblea Mundial de la Salud del 2005 sobre la revisión del Reglamento Sanitario Internacional (WHO, 2005), que incluye dengue como ejemplo de una enfermedad que puede constituir un problema de salud pública de importancia internacional con implicaciones para la seguridad sanitaria debido a la rápida propagación de la epidemia más allá de las fronteras nacionales.



**Figura 2.** Promedio anual de casos de fiebre por dengue (DF) y dengue hemorrágico (DHF) reportados a OMS y reporte de casos de dengue de países, 1955–2007 (WHO, 2009).

### e) Sintomatología

La infección con cualquiera de los cuatro serotipos del DENV produce un cuadro clínico variado que va desde una infección inaparente, pasando por el dengue clásico (DC) hasta formas más graves como el dengue hemorrágico (DH) y el síndrome de choque por dengue (SCD), este último puede producir la muerte del paciente (Gubler, 1998).

Los síntomas comunes de un paciente de dengue clásico son fiebre, fatiga, erupción cutánea, dolor de cabeza, dolor retro-ocular (dolor detrás de los ojos), artralgia (dolor articular) y mialgias (dolor muscular), náuseas, vómitos y leucopenia (deficiencia anormal de los leucocitos que circulan en la sangre). Los casos más extremos pueden incluir hemorragia severa, pérdida de conciencia y función anormal del hígado y del cerebro (Rigau-Pérez *et al.*, 1998).

Aunque la mayoría de los pacientes se recuperan después de un curso clínico benigno y de resolución espontánea, un porcentaje pequeño progresa a casos graves, caracterizada principalmente por aumento de la permeabilidad vascular, con hemorragia o sin ella. La rehidratación intravenosa es el tratamiento de elección en los casos graves; esta intervención ayuda a reducir la tasa de letalidad a menos de 1%. Es muy difícil predecir cuál grupo progresa de la forma no grave a la grave de la enfermedad, lo que genera gran

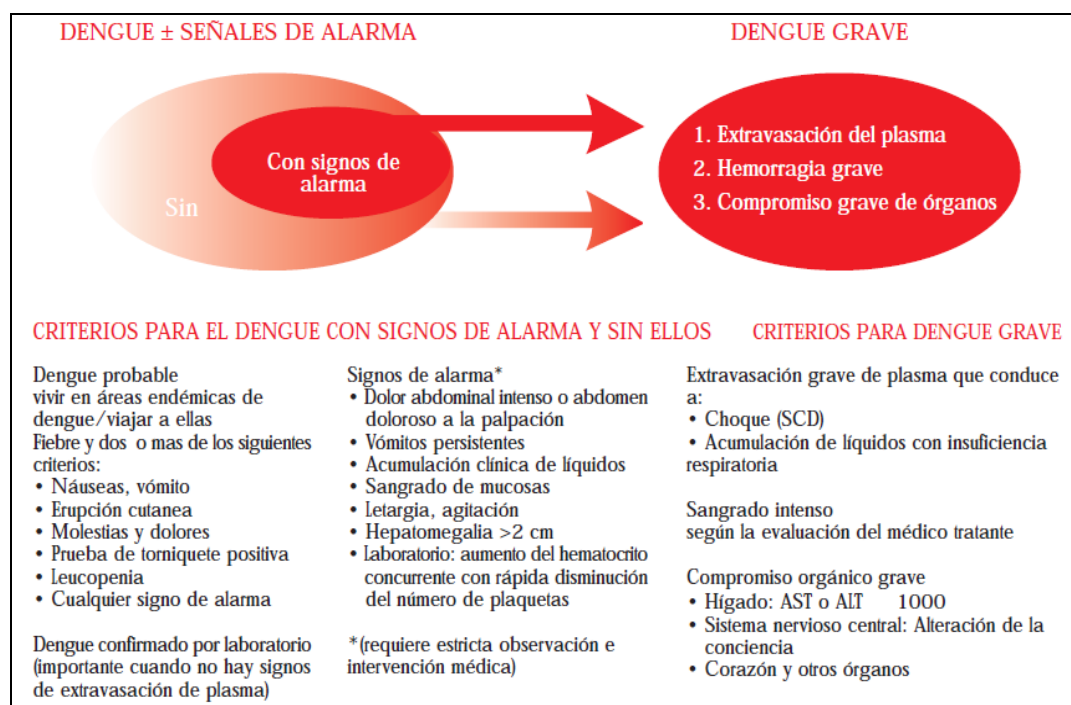
preocupación ya que un tratamiento apropiado y oportuno puede evitar que se desarrollen condiciones clínicas más graves.

Los cambios actuales en la epidemiología del dengue, conducen a problemas con el uso de la actual clasificación de la OMS. Las infecciones sintomáticas por el virus del dengue se agruparon en tres categorías: fiebre indiferenciada, fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue. Además, esta última se clasificó en cuatro grados, según su gravedad, en donde los grados III y IV corresponden al síndrome de choque por dengue (WHO, 1997). Ha habido muchos informes sobre dificultades en el uso de esta clasificación (Guha-Sapir, 2005; Deen, 2006; Rigau-Perez, 2006), los cuales se resumen en una revisión sistemática de la literatura (Bandyopadhyay, 2006). Las dificultades en la aplicación de los criterios clínicos para la fiebre hemorrágica por dengue, junto con el aumento en los casos de dengue clínicamente graves que no cumplen con los estrictos criterios para ese diagnóstico, llevaron a solicitar que se reconsiderara la clasificación. Actualmente, la clasificación de fiebre por dengue/fiebre hemorrágica por dengue/síndrome de choque por dengue continúa utilizándose ampliamente (WHO, 1997).

Se coordinó un estudio multicéntrico clínico prospectivo apoyado por OMS/TDR en las regiones con dengue endémico, con el fin de recopilar información sobre los criterios para la clasificación del dengue de acuerdo con su gravedad. Los hallazgos del estudio confirmaron que, utilizando una serie de parámetros clínicos, de laboratorio o ambos, se puede observar una diferencia bien definida entre el dengue grave y el no grave. Sin embargo, por razones prácticas fue conveniente dividir el gran grupo de pacientes con dengue no grave en dos subgrupos: dengue con signos de alarma y dengue sin signos de alarma. Los criterios para el diagnóstico de dengue (con signos de alarma y sin ellos) y dengue grave, se presentan en la Figura 3. Se debe tener en cuenta que los pacientes con dengue sin signos de alarma pueden desarrollar dengue grave.

Los grupos expertos de consenso en América Latina (Cuba, 2007), Asia Suroriental (Kuala Lumpur, Malasia, 2007), y en las oficinas principales de la OMS en Ginebra, Suiza en 2008 acordaron que “el dengue es una sola enfermedad con presentaciones clínicas diferentes y a menudo con evolución clínica y resultados impredecibles”.

La clasificación según la gravedad tiene un gran potencial para su uso práctico por los médicos tratantes, para decidir dónde y cuan intensivamente se debe observar y tratar al paciente (es decir, el triaje, especialmente útil en los brotes), para una notificación de casos más acorde con el sistema de vigilancia epidemiológica nacional e internacional y como una medida final en los ensayos de vacunas y medicamentos contra el dengue. Este modelo de clasificación del dengue fue sugerido por un grupo de expertos (Ginebra, Suiza, 2008) y se está poniendo a prueba actualmente en 18 países, comparando su desempeño en la práctica con la actual clasificación de la OMS. Por razones prácticas, en esta guía se distingue entre dengue y dengue grave. Además, la guía utiliza tres categorías para el manejo de casos (A, B, C).



**Figura 3.** Clasificación de casos de dengue sugerida y niveles de gravedad (WHO, 2009).

#### f) Vectores y los ciclos de transmisión

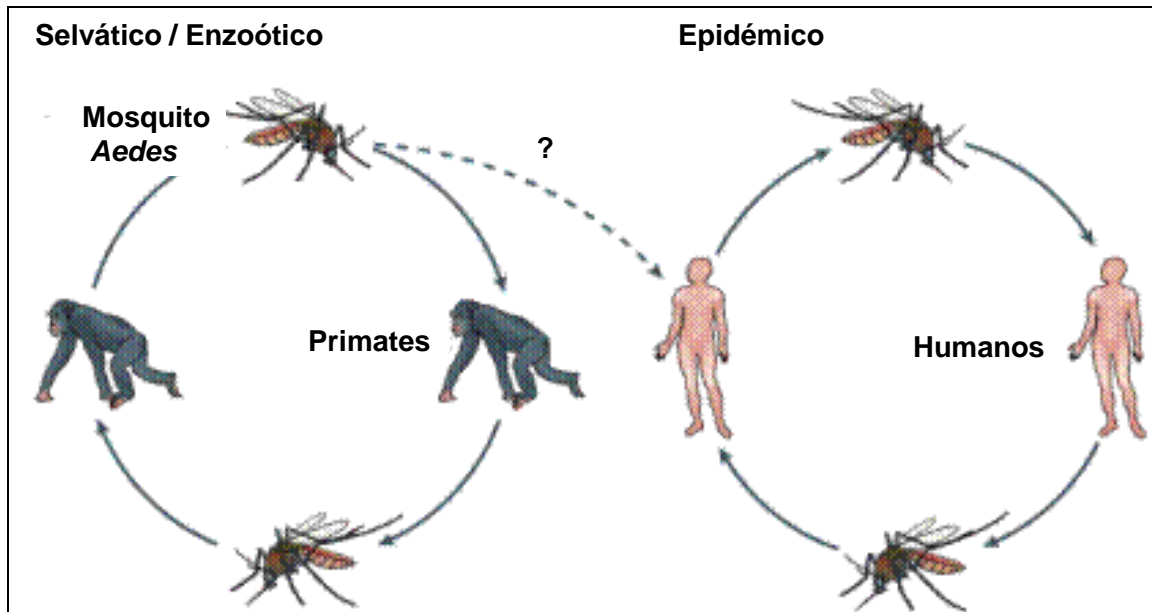


El dengue se transmite de persona a persona a través de las picaduras de los mosquitos hembra infectados. El agente etiológico, el DENV, se cree que se han mantenido en los ciclos de transmisión selvático/enzoótica que implican hospederos primates no humano y especies de vectores que viven en los bosques (Figura 4).

El virus fue transmitido a los humanos cuando los dos entran en contacto y fue a partir de entonces que se ha mantenido el ciclo continuo humano-mosquito en o alrededor de centros de población humana.

Muchas especies de género *Aedes*, de la familia de los culícidos son conocidos por transmitir DENV, pero el principal vector es *Aedes aegypti* que es también el vector del virus de la fiebre amarilla (VFA). Además, esta especie transmite otra arbovirosis, Chikungunya, que es causada por el virus de Chikungunya (CHICKV), un Alfavirus de la familia Togaviridae. Chikungunya que tiene síntomas similares al dengue, que lo hace difícil distinguir clínicamente.

El australiano Thomas Lane Bancroft sugirió por primera vez en 1906 que *Aedes aegypti* era portador de la fiebre del dengue sobre la base de razones epidemiológicas y esto fue confirmado en 1916 por John Cleland (Cleland *et al.*, 1916). *Aedes aegypti* es conocido por ser un mosquito de hábito diurno que prefiere reproducirse en contenedores de agua domiciliaria o peridomiciliaria. Su adaptación a los hábitats humanos y la resistencia de los huevos a la desecación ha permitido que se mantenga en los centros urbanos.



**Figura 4.** Transmisión de los virus dengue (Whitehead *et al.*, 2007).

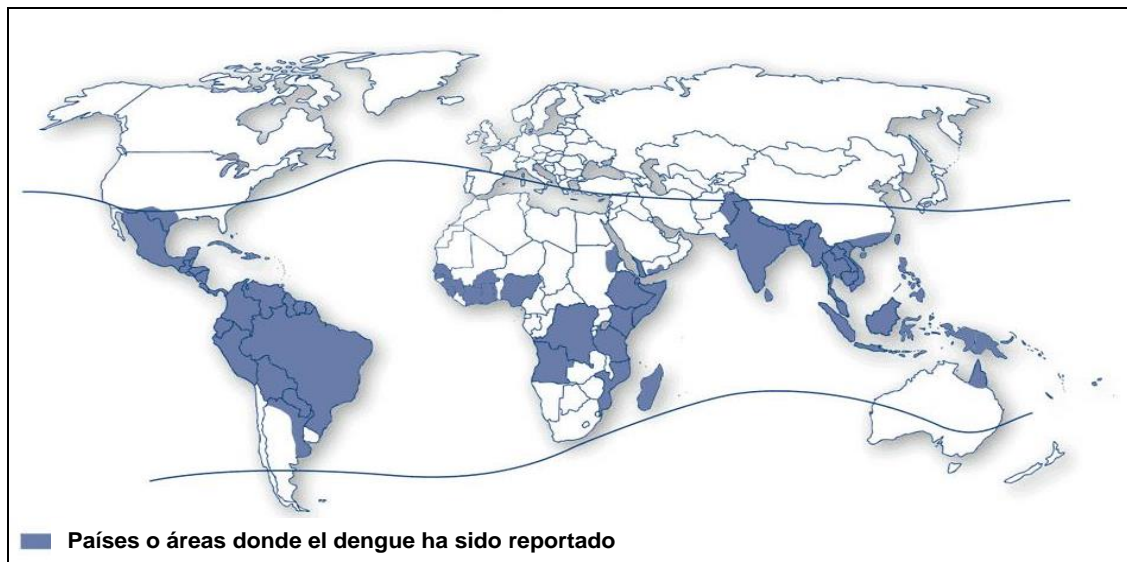
El vector secundario del dengue es *Aedes albopictus*, que es conocido como el mosquito tigre asiático. Su papel como vector del dengue en regiones semi-tropicales se identificó por primera vez por Koizumi *et al.* en Taiwán en 1917 (Kuno, 2007). *Ae. albopictus* sirve como el principal vector de dengue en países en los que *Ae. aegypti* está ausente y como un vector de mantenimiento en las zonas rurales áreas donde ambas especies coexisten (Smith, 1956; Gratz, 2004). En las islas del Pacífico, *Ae. polynesiensis* ha sido sugerido como el vector primario del dengue (Rosen *et al.*, 1954; Freier and Rosen, 1987) mientras que *Ae. scutellaris* fue identificado como el vector "jungla" del dengue (Mackerras, 1946).

Al igual que *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* también es un vector eficaz para CHICKV y se ha incriminar como vector de las grandes epidemias de Chikungunya en los últimos años (Bessaud *et al.*, 2006; Bonilauri *et al.*, 2008). *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* han demostrado ser antropofílicos (Ponlawat and Harrington, 2005) y están ampliamente distribuidos en las zonas urbanas y semi-urbanas en los trópicos y subtrópicos. Ambas especies han demostrado poseer alta competencia vectorial para DENV (Moncayo *et al.*, 2004). En ausencia de una vacuna y el tratamiento específico, el control eficaz del vector (ya sea la eliminación del mosquito adulto, la

aplicación de larvicidas o la reducción de su habitat de reproducción) es actualmente el único método práctico disponible para reducir la incidencia de la enfermedad del dengue.

#### **g) Distribución geográfica del *Aedes aegypti***

El DENV es el arbovirus de mayor distribución geográfica que esta intrínsecamente relacionado al rango de vuelo y hábitat de los principales vectores (Figura 5).



**Figura 5.** Áreas de riesgo para dengue. Las líneas definen el área donde puede sobrevivir el mosquito *Aedes aegypti* (Adaptado de OMS).

#### **h) Factores que influyen en la transmisión**

Existe un gran número de factores inter-relacionados que contribuyeron a la prevalencia del dengue en todo el mundo. Para enfermedades transmitidas por vectores como el dengue, estos factores se pueden clasificar en tres componentes principales: virus, vector y hospedero; un cuarto componente menos claro es la ecología circundante para los otros tres. Los cuatro componentes juegan roles importantes para la propagación y transmisión del dengue.

El crecimiento urbano, la pobreza, sistemas de salud pública ineficientes, medios de transporte rápidos, globalización del comercio y aumento de viajes internacionales han sido implicados como factores para la propagación del dengue en todo el mundo (Gubler y Clark, 1995). El crecimiento urbano es probablemente el factor más importante que contribuye a la falta de servicios de agua potable y los residentes recurren al uso de contenedores para almacenar el agua que muchas veces termina como criaderos del *Ae. aegypti*, la falta de sistemas de alcantarillado a menudo conduce al mismo resultado.

Diferencias inherentes a la virulencia de las cepas de DENV también se han sugerido como un factor que contribuye en la causa de los brotes y en la aparición de formas severas de la enfermedad del dengue.

Un ejemplo citado a menudo es el reemplazo del DENV-2 genotipo americano en el hemisferio Occidental con un genotipo del sudeste asiático (Rico-Hesse *et al.*, 1997). Se ha demostrado en el laboratorio que los genotipos del sudeste asiático se adaptan mejor a la transmisión por *Ae. aegypti*, produciendo viremia altas en las células dendríticas humanas y células de mosquitos (Armstrong y Rico-Hesse, 2001; Cologna *et al.*, 2005; Anderson y Rico-Hesse, 2006).

La disminución de los esfuerzos en el control del vector, dispersión del vector y la resistencia del vector a insecticidas (Gubler y Clark, 1995; Kawada *et al.*, 2009) son factores reconocidos que contribuyen al vector. El impacto de factores ambientales en la transmisión y dispersión de enfermedades transmitidas por mosquitos como la temperatura, precipitación y humedad también están bien documentados.

Al lado del efecto de factores climáticos mundiales (el calentamiento global, por ejemplo) la ecología local probablemente juega un papel igual, si no más importante en una enfermedad tan compleja como el dengue (Kuno, 1995; Reiter, 2008; Johansson *et al.*, 2009).

## **i) Impacto económico**

Además del dolor físico, el dengue produce un costo económico en los pacientes que se traduce en gastos de hospitalización y la interrupción del potencial de ingresos. El DALYs (años de vida perdidos por discapacidad) por dengue en el sudeste de Asia se estima que es comparable a la carga causada por enfermedades como el SIDA, la malaria y la tuberculosis (Gubler y Meltzer, 1999). A nivel gubernamental, grandes cantidades de dinero se destinan a campañas de sensibilización pública, servicios médicos y esfuerzos para control del vector. Otro costo indirecto se presenta en forma de pérdida de ingresos a través de la reducción del turismo (WHO, 1997).

Un reciente estudio del impacto económico del dengue en las Américas desde una perspectiva social teniendo en cuenta los datos del 2000 al 2007, estudios prospectivos de costo de las enfermedades y análisis de la sub notificación de los sistemas nacionales de vigilancia permiten estimar un costo promedio anual de 2.1 billones (dólares USA), con un rango de 1-4 billones. Los resultados ponen de relieve la importancia de la carga económica del dengue en las Américas superando enfermedades virales causadas por el virus del Papiloma Humano (VPH) o el Rotavirus. Debido a que este estudio no incluye algunos de los componentes (por ejemplo, el control de vectores) se puede todavía subestimar las consecuencias económicas totales de dengue (Shepard, 2011).

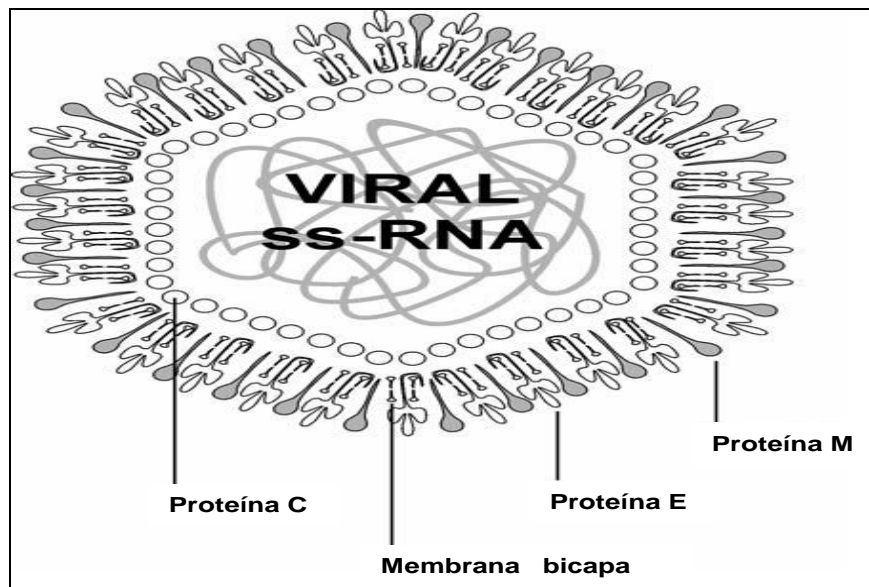
## **2.2. El virus dengue**

### **a) Clasificación**

El virus del dengue (DENV), pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, es un grupo de cuatro virus estrechamente relacionados, pero antigénicamente distintos y denotados como serotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. El DENV consiste en una molécula de RNA, de simple cadena, polaridad positiva de aproximadamente 11 kb, que codifica para 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales (NS) en el siguiente orden 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (Lindenbach *et al.*, 2001).

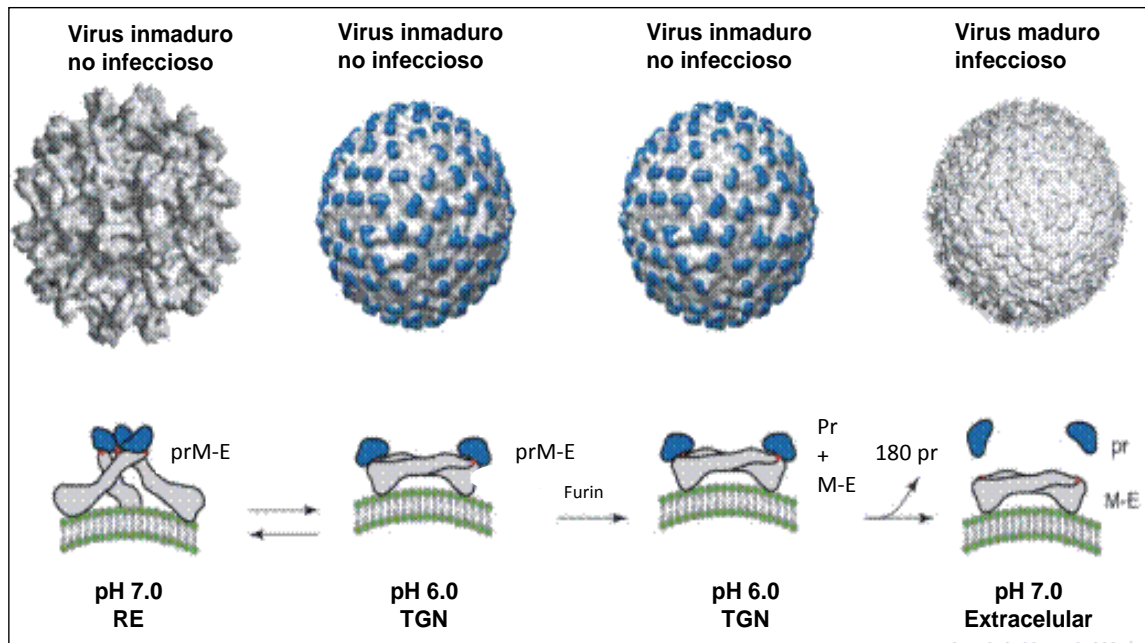
## b) Estructura del virión

El virión del DENV es una partícula pequeña, esférica, de 40 a 50 nm de diámetro, compuesto por un núcleo electro denso rodeado de una bicapa lipídica. Tres proteínas virales se asocian al virión: la proteína de envoltura (E), la proteína de Cápside (C) y la proteína de membrana (M), la cual es un fragmento proteolítico derivado de su proteína precursora prM (Figura 6).



**Figura 6.** Partícula viral del DENV y sus principales componentes (Barth M., 2000).

La superficie está conformada por 180 copias de la proteína M y 180 copias de la proteína E, cada una insertada en la envoltura viral a través de dos dominios transmembrana antiparalelos (Zhang *et al.*, 2003). La proteína E se dispone formando homodímeros orientados “cabeza con cola” que yacen paralelos a la envoltura viral, por lo que la superficie del virión es lisa y carente de espículas (Figura 7).

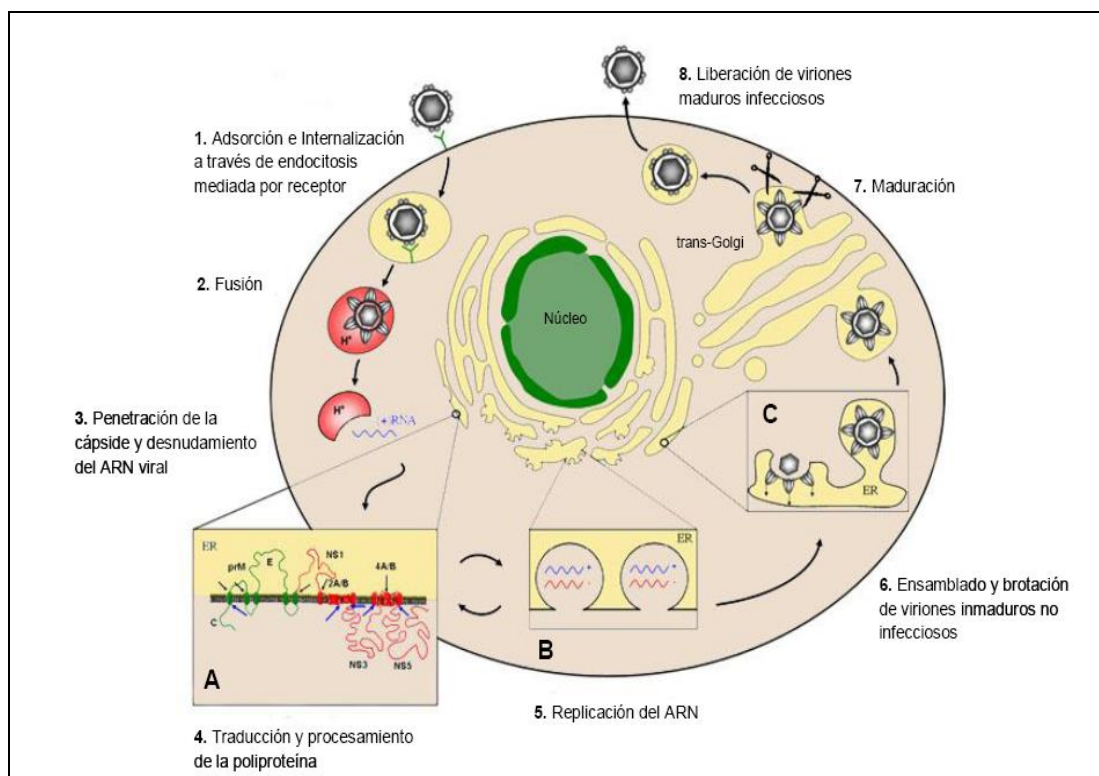


**Figura 7.** Estructura del virión de DENV y conformación de la proteína E. ER: retículo endoplasmático; TGN: Red trans-Golgi; prM: precursor de membrana (Perera *et al.*, 2008).

La nucleocápside se encuentra por debajo de la envoltura lipídica que consiste en múltiples copias de la proteína C unidas al RNA genómico de polaridad positiva. El virión presenta simetría icosaédrica que estaría impuesta por las interacciones entre las proteínas de superficie más que por la nucleocápside, la que se presenta de manera desordenada y orientada al azar con respecto a la disposición de la envoltura (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003).

### c) El ciclo de replicación viral

El inicio del ciclo de replicación de DENV se encuentran en investigación, sin embargo, muchos coinciden que el ciclo comenzaría con la unión del virus a su receptor celular, seguido de la internalización de las partículas virales hasta un compartimento endocítico en donde ocurriría la fusión de membranas. Una vez liberado en el citoplasma celular, el genoma viral da inicio a los procesos de traducción y replicación (Figura 8). Las funciones de las proteínas no estructurales se describen en la Tabla 1.



**Figura 8.** Ciclo de replicación del virus dengue.

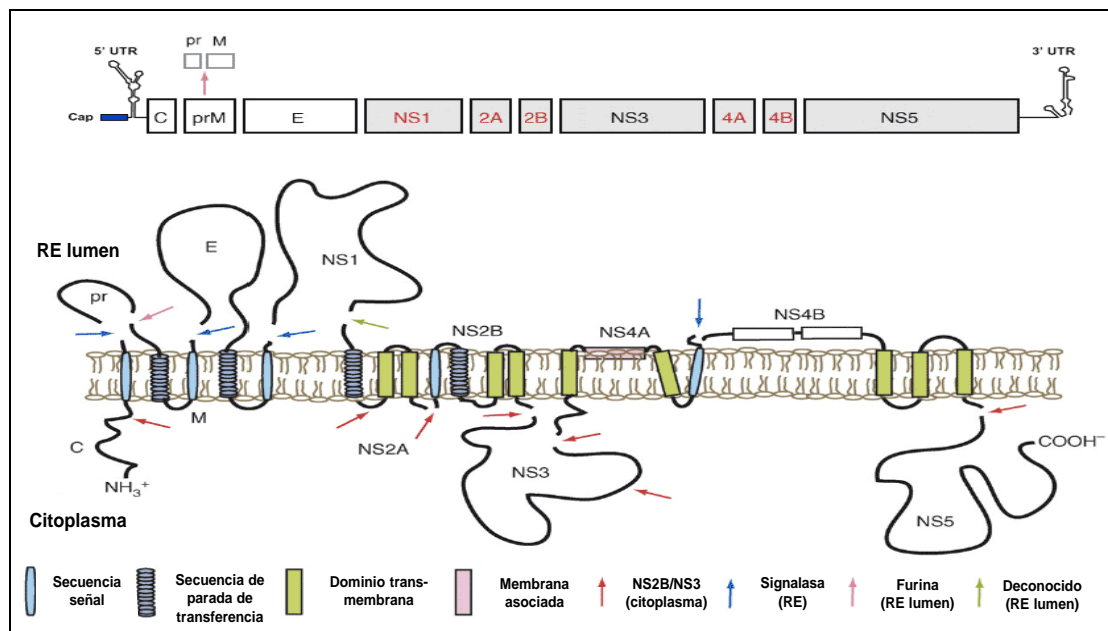
**Tabla 1.** Funciones de las proteínas no estructurales del virus dengue (Perera *et al.*, 2008).

Proteínas No Estructurales	Descripción de funciones conocidas
NS1	Juega un papel en la replicación del ARN viral, actúa como antígeno soluble de fijación del complemento.
NS2A	Forma parte del complejo de replicación del ARN.
NS2B	Co-factor para la proteasa NS3
NS3	Serina Proteasa, ARN Helicasa y RTPasa / NTPasa.
NS4A	Posiblemente induce importantes alteraciones de membrana para la replicación del virus.
NS4B	Posiblemente bloquea IFN $\alpha$ / $\beta$ -inducida por la señal de transducción.
NS5	Metil Transferasa (MTasa) y ARN dependiente de ARN-polimerasa (RdRp).



Por fuera del marco de lectura del ARN genómico se encuentran las regiones 5' y 3' no codificantes. En el extremo 5' posee una estructura de *cap* tipo I (m7GpppAmpN2) y carece de cola poliadenilada en su extremo 3' (Clyde *et al.*, 2006). Este genoma se utiliza directamente como RNAm, el cual posee un único marco de lectura abierto (ORF) que es traducido dando una poliproteína.

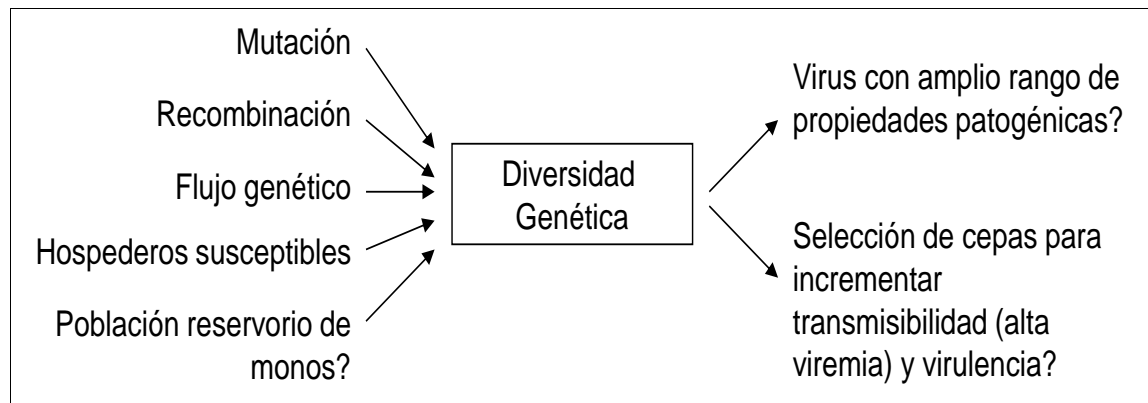
La traducción y la replicación del genoma de los virus ARN positivos ocurren asociadas a estructuras membranosas (Miller *et al.*, 2008) y en particular en el caso de DENV estos procesos ocurren en estrecha asociación a membranas y vesículas derivadas del retículo endoplasmático (Welsch *et al.*, 2009). Durante el proceso de traducción, las secuencias de translocación y de detenimiento de la translocación de la poliproteína determinan su topología en la membrana del retículo (Cauchi *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 2006). Esta poliproteína es clivada co- y post-traduccionalmente por proteasas virales y celulares dando las 10 proteínas del virus (Figura 9) (Falgout y Markoff, 1995; Lindenbach y Rice, 2001).



**Figura 9.** Organización del genoma del virus dengue (arriba) y topología de la membrana y sitios de clivaje proteolítico de la poliproteína transcrita. Proteasas celulares y virales, que se denotan por flechas, procesan la poliproteína inmadura en diez proteínas separadas (abajo) (Perera y Kuhn, 2008).

#### d) Diversidad Genética

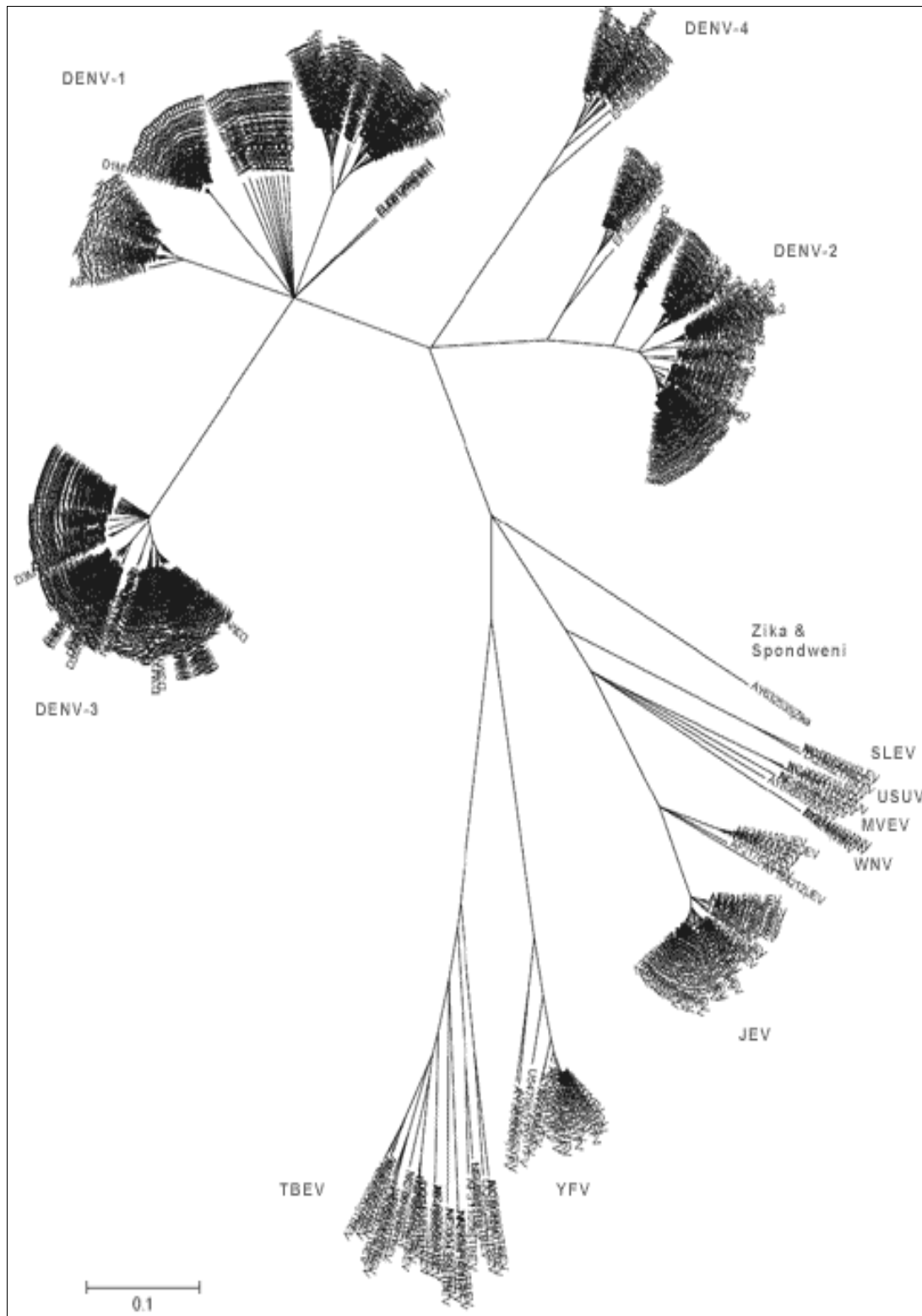
Sobre la base de datos moleculares disponibles, se conoce que existe una gran diversidad genética entre los virus de DENV. Los factores que contribuyen a esta diversidad son varias, generando consecuencias epidemiológicas (Figura 10).



**Figura 10.** Factores que contribuyen a la diversidad genética del virus dengue y dos consecuencias evolutivas posibles (Holmes and Burch, 2000).

Generalmente los cuatro serotipos del dengue son tratados como el mismo virus y las presentaciones clínicas que causan son consideradas como la misma enfermedad. Sin embargo, las distancias genéticas entre los cuatro serotipos son mayores que las distancias entre muchas de las especies de virus reconocidas en el género, por ejemplo, entre el virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus del Nilo Occidental (VON), virus de la encefalitis del Valle Murray (MVEV), virus Usutu (USUV) y virus Encefalitis de San Louis (VESL) (Figura 11).

Basado en esta observación, varios autores han argumentado que los cuatro serotipos del DENV tendrían que ser considerados especies diferentes (Kuno *et al.*, 1998; Holmes and Burch, 2000).



**Figura 11.** Árbol filogenético no enraizado (Minimum Evolution) para el gen E de 554 flavivirus. Las distancias genéticas entre los cuatro serotipos del dengue son mayores que las distancias entre muchas especies dentro del complejo antigénico de la encefalitis transmitida por garrapatas y encefalitis japonesa (Swee, 2010).

### 2.3. Genotipos del DENV

Los serotipos del virus dengue pueden ser clasificados en varios grupos genéticos denominados genotipos (también se utiliza el término subtipo en forma indistinta) basados en la diversidad de secuencias genéticas.

Inicialmente se estableció genotipos para DENV-1 y DENV-2 a los grupos de virus que no tuvieran más de 6% de divergencia nucleotídica para una región de 240 nucleótidos de la E/NS1 (Rico-Hesse, 1990). Desde entonces, tanto el tamaño y región del genoma del virus sirven para establecer genotipos y varían en función de los grupos de investigación, los criterios pueden ir desde secuencias completas de genes hasta genomas completos del DENV. Ahora la asignación de genotipos se basa en el análisis filogenético en lugar de arbitrarios valores de corte de la diversidad de la secuencia nucleotídica. Se ha publicado una descripción detallada de la clasificación de genotipos de los cuatro serotipos del DENV (Rico-Hesse, 2003; Vasilakis, *et al.*, 2011).

#### a) Genotipos del serotipo DENV-1

DENV-1 está dividido en cinco genotipos: I, II, III, IV y V (Tabla 2), esta clasificación se basa en las secuencias de 240 nucleótidos de la unión E/NS1 (Rico-Hesse, 1990) y gen completo de Envoltura (Gonçalves *et al.*, 2001).

**Tabla 2.** Clasificación de Genotipos del DENV-1 de acuerdo a Gonçalves *et al.*, (2001)

GENOTIPOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
I	Japón, Hawaii en 1940s (cepa prototipo), China, Taiwán y Sudeste asiático
II	Tailandia en los 1950s y 1960s
III	Área selvática de Malasia
IV	Nauru, Australia, Indonesia y Las Filipinas
V	África, Sudeste asiático y América.

Los genotipos del DENV-1 tienen una amplia distribución en el mundo excepto el genotipo II (cepas de Tailandia de la década de 1950s y 1960s) y el genotipo III (selvático). Los genotipos I y IV recientemente han causado brotes epidémicos en el Pacífico, 2000 - 2004 (Nuegoonpipat *et al.*, 2004), el genotipo V causa frecuentemente epidemias en el continente americano. Sin embargo no se puede concluir cuál de estos tres genotipos (I, IV y V) es el que está más asociado a los casos graves de dengue (Rico-Hesse, 2003).

#### **b) Genotipos del serotipo DENV-2**

Se ha propuesto la clasificación de seis genotipos para DENV-2 en base a las secuencias de 240 nucleótidos de la unión E/NS1 (Rico-Hesse, 1990) y al gen completo que codifica la proteína de la Envoltura (Lewis *et al.*, 1993; Twiddy *et al.*, 2002). Las cepas selváticas aisladas de varios países de África Occidental y Malasia están estrechamente relacionadas, pese a la distancia geográfica (Wang *et al.*, 2000) llegando a la hipótesis de un ancestro selvático de DENV en la región de Asia-Oceanía mucho antes de la divergencia en cuatro serotipos de DENV que existen actualmente (Tabla 3).

La primera epidemia de dengue hemorrágico (FDH) en las Américas se produjo después de la introducción del genotipo asiático a Cuba en 1981 (Guzmán *et al.*, 1995). Asimismo, el genotipo América/Asia (genotipo III) sustituyó al preexistente genotipo americano (genotipo V) en el hemisferio Occidental (Rico-Hesse *et al.*, 1997) y se considera actualmente que es el genotipo del DENV-2 con mayor impacto epidémico (Rico-Hesse, 2003).

**Tabla 3.** Clasificación de Genotipos del DENV-2 de acuerdo a Twiddy *et al.*, (2002)

GENOTIPOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
Asia I	Tailandia, Myanmar y Malasia.
Asia II (subtipo I y II)	China, Las Filipinas, Sri Lanka, Taiwan y Vietnam. (Incluye la cepa prototipo New Guinea C).
América/Asia (subtipo III)	China, Vietnam, Tailandia y América Latina desde 1980.
Cosmopolita (subtipo IV)	Australia, Islas del Pacífico, Sudeste asiático, India, islas del Océano Índico, Oriente Medio, Este y Oeste de África.
Americano (subtipo V).	América Latina, Cepas antiguas de la India (1975), El Caribe y las islas del Pacífico entre 1950s y 1970s.
Selvático	Aislado de primates no humanos en el África Occidental y Malasia.

### c) Genotipos del serotipo DENV-3

DENV-3 se clasifica en cuatro genotipos DENV-3 (I, II, III, IV) sobre la base de las secuencias nucleotídicas de la región PrM/E (Lanciotti *et al.*, 1994) y una región de 195 nucleótidos en el extremo 5' del gen E (Chungue *et al.*, 1993) (Tabla 4).

Introducido a América a través de Nicaragua en 1994, el genotipo III ahora se encuentra ampliamente disperso en Centro y Sur América (Balmaseda *et al.*, 1999; Usuku *et al.*, 2001; Messer *et al.*, 2003) y es considerado el más virulento de los cuatro genotipos de DENV-3.

Se debe mencionar que el genotipo IV nunca se ha asociado con ninguna epidemia de dengue hemorrágico (Lanciotti *et al.*, 1994). Aunque se tiene evidencia de la presencia de anticuerpos contra DENV-3 en primates no humanos, hasta ahora no se han encontrado linajes selváticos de DENV-3 (Rudnick, 1984).

**Tabla 4.** Clasificación de genotipos de DENV-3 de acuerdo a Lanciotti *et al.*, (1994)

GENOTIPOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
I	Indonesia, Malasia, Tailandia, Birmania, Vietnam, Filipinas y el sur de las islas del Pacífico (Polinesia Francesa, Fiji y Nueva Caledonia). Incluye la cepa prototipo H87
II	Tailandia, Vietnam y Bangladesh.
III	Singapur, Indonesia, islas del Pacífico Sur, Sri Lanka, India, África y Samoa.
IV	Puerto Rico y la Polinesia Francesa (Tahití).

#### d) Genotipos del serotipo DENV-4

Se clasifica en cuatro genotipos: I, II, III y selvático (Tabla 5). Se identificó los genotipos I y II basados en los estudios de la secuencia completa del gen E (Lanciotti *et al.*, 1997), posteriormente se describe el genotipo III que solo se encuentra en Bangkok, Tailandia (Klungthong *et al.*, 2004), el genotipo selvático se encuentra en primates no humanos en Malasia.

El genotipo II está ampliamente disperso respecto a los otros genotipos, su introducción al continente americano se produjo en 1981, posiblemente a través de las islas del Pacífico (Lanciotti *et al.*, 1997; Foster *et al.*, 2003). Aunque DENV-4 es el serotipo detectado con menos frecuencia, está asociado con la fiebre hemorrágica durante la infección secundaria (Vaughn, 2000).

**Tabla 5.** Clasificación de genotipos DENV-4 y su distribución en el mundo

GENOTIPOS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
I	Tailandia, Malasia, Filipinas y Sri Lanka. (incluye la cepa prototipo H241).
II	Indonesia, Malasia, Tahití, Islas del Caribe (Puerto Rico y República Dominicana) y las Américas.
III	Tailandia (Bangkok).
Selvático	Aislada de los primates no humanos en Malasia.

#### 2.4. Estudios previos

Schneider and Droll, (2001) describieron para el Perú los primeros reportes clínicos de brotes de un síndrome febril compatible con dengue clásico, fueron descritos en 1700, 1818, 1850 y 1876, aunque no se confirmó con pruebas de laboratorio.

Phillips *et al.*, (1992) reportaron el primer brote epidémico documentado de dengue clásico ocurrido en marzo a julio del año 1990 en la ciudad de Iquitos y áreas aledañas al departamento de Loreto por los serotipos 1 y 4. Los datos epidemiológicos indican que más de 150,000 personas pudieron infectarse solo en Iquitos. En otro brote ocurrió en Tarapoto, departamento de San Martín, se determinó la presencia del serotipo 1. En ambos brotes no se reportaron casos de dengue hemorrágico. Si bien hubo una comunicación escrita de serotipo 4 en el brote del Perú, este hallazgo no fue confirmado. El serotipo que circuló en 1990 en Iquitos y otras ciudades de la Amazonia correspondió al serotipo 1.

Watts *et al.*, (1999) realizaron un estudio prospectivo para investigar las características del DENV-2 genotipo americano en la población de Iquitos. Entre 1990 y 1996, realiza una cohorte de 129 niños entre 7 a 20 años de edad



elegidos al azar de una muestra inicial de 1 336 individuos de diferentes colegios en la ciudad amazónica. Se obtuvieron muestras sanguíneas de todos ellos entre 1993 a 1995. Las primeras muestras indicaron que era una población con altas tasas de infección inicial por DENV-1 (1990). La última muestra fue obtenida luego de una epidemia por DENV-2 en mayo - octubre de 1995, confirmada mediante aislamiento del virus y/o serología por ELISA de captura en 165 casos. De ésta manera se obtuvo que 78 (60,5%) de los 129 integrantes de la cohorte tuvieron infección secundaria por DENV-2. Las extrapolaciones correspondientes a la población de Iquitos, mostraron que 49 266 de 81 479 niños (60,5%) entre 5 y 14 años censados en 1993, tuvieron una infección secundaria por DENV-2 en 1995, por lo que se esperaba entre 887 y 10247 casos de FHD y SCD con una mortalidad del 1 al 5%, esto al compararlo, principalmente, con un estudio prospectivo llevado a cabo en Rayong – Tailandia en 1980 en el cual la quinta parte de niños en edad escolar con infección secundaria por DENV-2, sobre una infección primaria por DENV-1 desarrollaron FDH/SCD. Sin embargo no se reportó ningún caso de enfermedad severa en completa contraposición a lo acontecido en otros países de la región. El virus aislado fue DENV-2 serotipo americano, nuevamente en contraposición a los serotipos del sudeste asiático aislados en los otros casos.

Montoya *et al.*, (2003) reportaron un estudio durante el brote de dengue en los departamentos del noroeste del Perú entre mayo de 2000 mayo de 2001, se obtuvieron fichas clínicas y muestras de sangre de 1 652 pacientes que presentaban manifestaciones clínicas compatibles con dengue. Se realizó aislamientos del virus en 278 (16,8%) muestras, se utilizó anticuerpos monoclonales específicos y RT- PCR para la tipificación.

Se determinó el genotipo de la mayoría de los aislamientos de DENV-2 mediante polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Los miembros de cada serotipo y dos genotipos de virus DENV-2 fueron aislados: DENV-1 (n = 93); DENV-2 (n = 104) genotipo asiático, DENV-2 (n = 1) genotipo América, DENV-2 (n = 53) genotipo no determinado; DENV-3 (n = 25) y DENV-4

(n = 2). Los representantes de cada serotipo y representantes de genotipo para DENV-2 fueron confirmados por análisis parcial de secuencias.

Mostorino *et al.*, (2002) establecieron la distribución geográfica de los serotipos del virus dengue en el Perú en el año 2001 e identificó las manifestaciones clínicas asociadas a dichos serotipos a partir de las muestras que ingresaron al Instituto Nacional de Salud (INS), Perú. En este estudio transversal analítico se incluyó 236 pacientes cuyas muestras sanguíneas resultaron confirmatorias de dengue por el método del aislamiento viral, realizado en el laboratorio de arbovirus durante el año 2001. Los cuatro serotipos del dengue estuvieron circulando en el Perú en el año 2001 (DENV-3 y DENV-4). Los pacientes con infección por el serotipo DENV-2 presentaron mayores síntomas y signos que aquellos infectados con DENV-1 y DENV-3; siendo este último serotipo el que produjo menor sintomatología en los pacientes.

Mamani *et al.*, (2005) identificaron mediante RT-PCR y sitios específicos de restricción - reacción en cadena de la polimerasa (RSS-PCR) al agente causal del primer brote epidémico de dengue debidamente caracterizado en el distrito de Comas, Lima en abril del año 2005. Los análisis presentaron un producto amplificado de 290pb que correspondió al dengue serotipo 3 (DENV-3). El análisis de los productos de RSS-PCR correspondió al genotipo III.

Kochel *et al.*, (2008) realizaron un enfoque filogenético para identificar las variantes genéticas de DENV-3 subtipo III que puedan haber surgido durante o después de su expansión en América del Sur. Secuenciaron los genes de la Cápside, Premembrana/Membrana y Envoltura de 22 cepas aisladas de DENV-3 cepas de Venezuela, Bolivia, Ecuador y Perú entre 2000 y 2005. El análisis filogenético demostró que los aislados secuenciados en este estudio formaron tres clados dentro del subtipo III: Venezuela, Bolivia y Ecuador-Perú.

Forshey *et al.*, (2009) reportaron que el DENV-4 surgió en el noreste de Perú, causando una gran epidemia y el desplazamiento de DENV-3, que había predominado en los últimos 6 años. El análisis filogenético de las cepas 2008 y

2009 apoyan su inclusión en el DENV-4 genotipo II, formando un linaje distinto de las cepas que habían circulado previamente en la región. Para caracterizar las cepas de DENV-4, se secuenció 1485 pb del gen E de un conjunto representativo de los virus de Guayaquil (n = 6), Tumbes (n = 6), Piura (n = 2), Trujillo (n = 1), Iquitos (n = 9), Yurimaguas (n = 7) y Lima (n = 2), todos colectados del 2000 al 2009. Los aislamientos de Perú desde el año 2006 compartieron una identidad > 99,5%, pero mostraron una identidad <97% con las cepas de DENV-4 colectadas en Ecuador y la costa de Perú del año 2000. En el nivel de aminoácidos, los aislamientos 2006-2009 fueron casi invariables con diferencia de aminoácidos <1.

Cruz *et al.*, (2010) evaluaron genotipos circulantes de DENV mediante la secuenciación de los genes prM y E de los aislados brasileños de DENV-2 y DENV-3 que se obtuvieron entre 1991 y 2008 de las diversas regiones geográficas. El análisis filogenético de DENV-2 demostró que el genotipo III (sudeste asiático / americano), a pesar de varios cambios de nucleótidos y aminoácidos, fue el único que circuló en los últimos 19 años. Respecto al DENV-3, los aislados desde el año 2000 que se han analizado han agrupado en el genotipo III (subcontinente indio) y no hubo evidencia de DENV-3 pertenecientes a otros genotipos de este estudio.

Ospina *et al.*, (2010) realizaron un estudio filogenético del DENV-3 en aislamientos obtenidos en el área metropolitana de Medellín, Colombia, entre 2002 y 2007. Encontraron la co-circulación de dos variantes diferentes de DENV-3 subtipo III durante los últimos 5 años del estudio. Adicionalmente realizaron un análisis completo de DENV-3 aislados en otras regiones de América del Sur revelando la existencia de tres linajes diferentes dentro del subtipo III: venezolano, brasileño y ecuatoriano, todos derivados de introducciones independientes. Este estudio documentó una importante diversidad genética de los virus circulantes en el mismo subtipo y una capacidad inusual de la población de esta ciudad para contribuir en la circulación continua de múltiples variantes del virus del dengue.

Mamani *et al.*, (2011) determinaron el genotipo del DENV-2 que circuló en la región Amazónica de Perú en el 2010 y 2011. Los resultados evidenciaron la introducción de un linaje diferente del DENV-2 genotipo América/Asia que ingresó a Perú a finales del 2010. Estos aislados encontrados en Iquitos y otras ciudades de Perú estaban muy relacionados con cepas de DENV-2 que circularon en Brasil durante el 2007 y 2008 que fueron asociados a casos de dengue grave y muertes.

Durand *et al.*, (2011) comunicaron que en diciembre de 2010 se inició el brote epidémico de dengue en Iquitos asociado con el nuevo genotipo del DENV-2. Según comunicación personal de los médicos del Hospital de Apoyo de Iquitos “César Garayar García”. Este brote, a diferencia de los anteriores, ocasionó la necesidad de incrementar el número de camas hospitalarias por la gran demanda de pacientes con signos de alarma y gravedad (según la última clasificación de la OMS), produjo el colapso de los servicios de emergencia, hospitalización y laboratorio en los primeros días del brote.

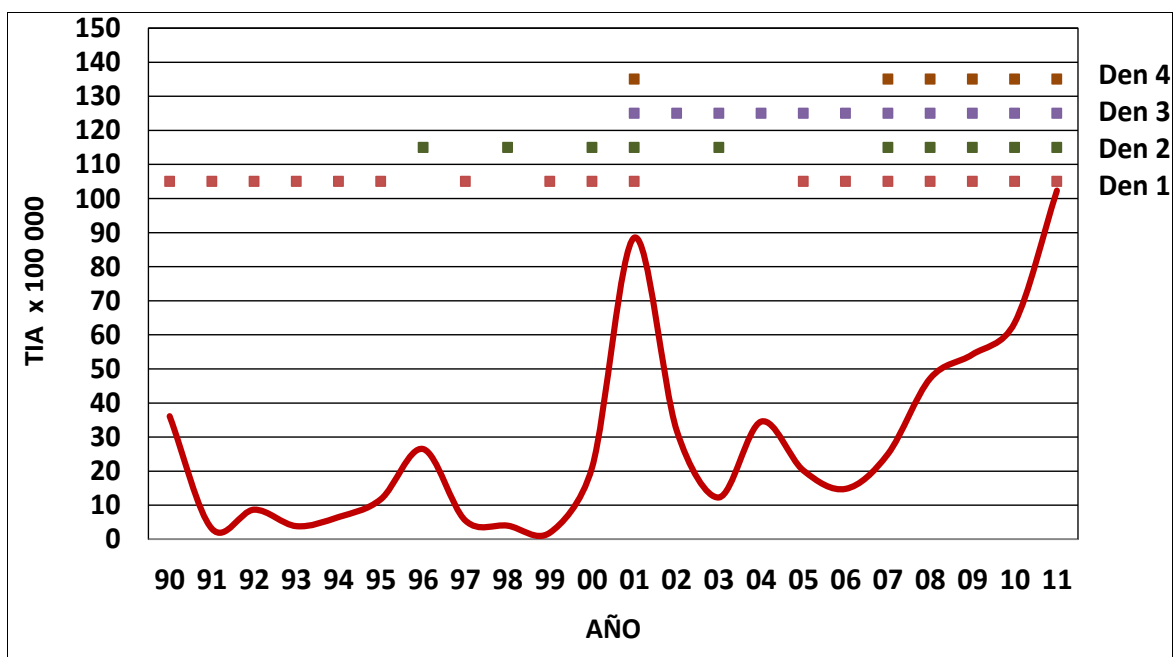
Consideraron que la emergencia de un nuevo linaje del DENV-2 genotipo América/Asia ocasionó un brote con gran impacto en la demanda de atención, con el colapso de los servicios hospitalarios y motivando acciones de emergencia para reorganizar los servicios. Este brote sugirió la necesidad de estar preparados para brotes similares en ciudades más pobladas con presencia del vector en ciudades de la selva, norte del país e incluso Lima, la capital del país.

Halsey *et al.*, (2012) realizaron un estudio para estimar y comparar la prevalencia de las manifestaciones clínicas no hemorrágicas debido a la infección por serotipos de DENV. Entre los años 2005-2010, se enrolaron pacientes con enfermedad febril de Perú, Bolivia, Ecuador y Paraguay en un estudio con pacientes ambulatorios de vigilancia pasiva. Las diferencias en la prevalencia de las manifestaciones clínicas fueron comparadas con los serotipos de DENV; 1 716 personas fueron identificadas por haber tenido infección por DENV-1 (39,8%), DENV-2 (4,3%), DENV-3 (41,5%), o DENV-4

(14,4%). Cuando los cuatro serotipos de DENV fueron comparados entre sí, las personas infectadas con el DENV-3 tenían una mayor prevalencia de las manifestaciones músculo esquelético y gastrointestinal. Las personas infectadas con el DENV-4 tenían una mayor prevalencia de las manifestaciones respiratorias y cutáneas.

Bona *et al.*, (2012) investigaron las variantes genéticas en los serotipos del DENV-1 y DENV-2 utilizando un fragmento de 368pb de la región que codifica la Cápside-Pre Membrana en aislamientos virales de muestras séricas provenientes de 11 municipios del Estado de Paraná, Brasil. Todas las cepas de DENV-1 pertenecían al genotipo V. Las cepas de DENV-2, por el contrario, pertenecían al genotipo América/Asia.

El Instituto Nacional de Salud de Perú realiza la vigilancia de serotipos en todo el país y contrasta la información con la Oficina de Epidemiología del Ministerio de Salud, de forma que se puede establecer la circulación de los diferentes serotipos en las zonas endémicas a través del tiempo, así como la incidencia de casos. La Figura 12 muestra la circulación de los cuatro serotipos a partir del año 1990 al 2011, se puede observar que en los últimos cinco años 2007-2011 se tiene la circulación de los cuatro serotipos en forma permanente con reporte de miles de casos, lo que incluye a Perú como un país endémico con circulación de los cuatro serotipos.



**Figura 12.** Tasa de incidencia acumulada de dengue y serotipos. Perú 1990-2011 (INS-DGE, 2011).

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. Hipótesis**

Los genotipos y linajes de los virus dengue estudiados presentan relación directa con el área geográfica y el año en que se obtuvo el aislamiento viral para el periodo 1998 a 2012.

#### **3.2. Objetivos**

##### **Objetivo general**

Identificar los genotipos y linajes de los cuatro serotipos del virus dengue a partir de los aislamientos obtenidos en muestras procedentes de diferentes regiones geográficas de Perú de 1998 a 2012.

##### **Objetivos específicos**

1. Identificar los serotipos en las cepas de los virus dengue mediante RT-PCR que amplifica el gen C.
2. Identificar los genotipos y linajes para los cuatro serotipos del DENV mediante secuenciación y análisis filogenético de la unión de los genes E/NS1.
3. Realizar la secuenciación y análisis filogenético del genoma completo de la cepa 1217776510, DENV-2, genotipo América/Asia.
4. Realizar el análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los fragmentos E/NS1 de los cuatro serotipos del DENV.
5. Establecer la distribución de los genotipos y linajes de los virus dengue según la región geográfica y año de aislamiento.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Identificación de los serotipos en las cepas de los virus dengue mediante RT-PCR que amplifica el gen C**

El diseño del estudio fue descriptivo - retrospectivo de las características genéticas de los cepas del DENV aislados en las diferentes áreas endémicas de dengue en Perú. Los materiales y equipos utilizados están detallados en las Tablas 6 y 7 (anexos), respectivamente.

El trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Metaxénicas Virales y Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, que pertenecen al Complejo de Biomedicina y Microbiología del Centro Nacional de Salud Pública - Instituto Nacional de Salud, ubicado en el distrito de Chorrillos, Lima.

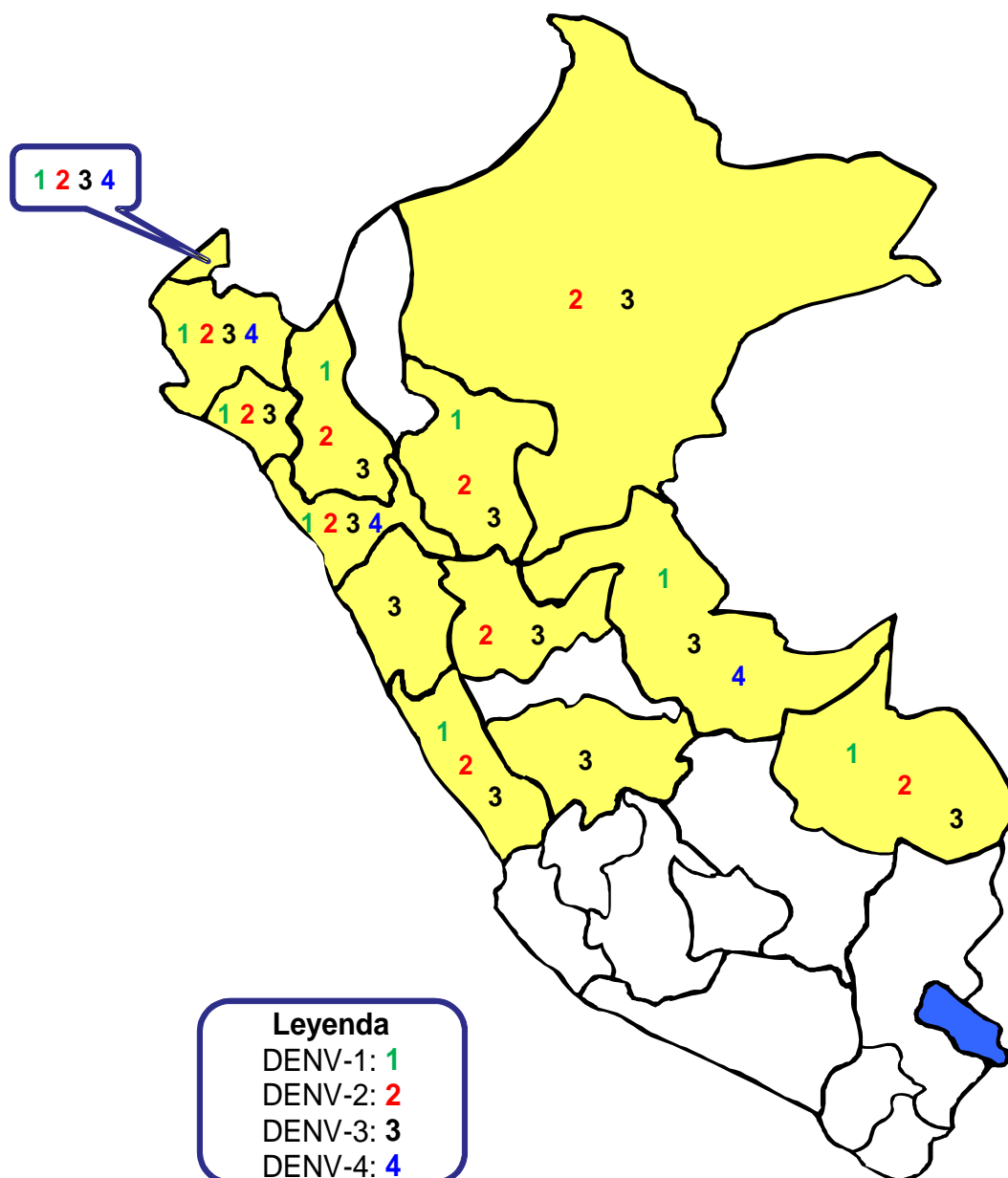
#### **4.1.1. Muestra**

Se obtuvieron 109 cepas del virus dengue previamente aislados mediante cultivo viral en la línea celular C6/36 de *Aedes albopictus*, todas las cepas estuvieron conservadas en -70°C hasta antes de su uso. Las cepas utilizadas correspondieron a los cuatro serotipos del virus: 20 cepas DENV-1, 27 cepas DENV-2, 52 cepas DENV-3; 10 cepas DENV-4.

Las muestras de DENV-1 fueron obtenidas de 9 regiones y corresponden al período 2003-2012; para DENV-2 se consideró 12 regiones para el período 1998-2012; respecto al DENV-3 se incluyó 14 regiones para el período 1999-2012 y finalmente, para DENV-4 se consideró 4 regiones para el período 1998-2012, según se detalla en las Tablas 8, 9, 10 y 11 (anexos).

La distribución de los serotipos del virus dengue de que han sido incluidos en el estudio según región geográfica se muestra en la Figura 13.





**Figura 13.** Distribución de las cepas de los virus dengue incluidos en el estudio según las diferentes regiones del país. Las áreas de color amarillo fueron las regiones donde se obtuvo las cepas, los números (1, 2, 3 y 4) indican que serotipos han sido incluidos en el estudio por cada región. No se obtuvo muestras para el estudio de las áreas sin color.

#### 4.1.2. Extracción de RNA mediante el uso del *kit Qiamp viral RNA* (Qiagen, 2010)

1. Las muestras, los buffers AVE, AW1, y AW2 fueron llevados a temperatura ambiente (entre 15 y 25 ° C).
2. Luego se pipeteó 560 uL. de buffer preparado AVL (*buffer con carrier*) en cada tubo de micro centrifuga de 1.5 mL.

3. Fueron adicionados 140 uL de sobrenadante de cultivo al buffer AVL en los tubos de micro centrífuga y mezclados utilizando vortex por 15 segundos.
4. Se realizó la incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos.
5. Los tubos fueron centrifugados por unos segundos para evitar la formación de aerosoles.
6. Se adicionó 560 uL de etanol (96-100%) a la muestra y mezcló por 15 segundos utilizando vortex, procediendo a centrifugar por unos segundos para evitar la formación de aerosoles.
7. Cuidadosamente fue aplicado 630 uL de buffer en la columna QIAamp y la centrifugación fue a 8 000 rpm por un minuto.
8. La columna *QIAamp* fue colocada en un tubo de colección de 2 mL y descartado el tubo que contenía el filtrado.
9. Cuidadosamente la columna fue aperturada y se procedió a repetir el paso 7.
10. Luego se abrió la columna *QIAamp* y adicionó 500 uL de *buffer* AW1, tapó y centrifugó a 8000 rpm por un minuto, colocando la columna en un tubo limpio y descartando el tubo que contenía el filtrado.
11. Cuidadosamente se abrió la columna y se adicionaron 500 uL de *buffer* AW2, y se centrifugó a 14 000 rpm por 3 minutos, se descartó el tubo, colocándolo en un vial limpio.
12. Finalmente se abrió la columna y adicionó 60 uL de *buffer* AVE, hubo un reposo de un minuto para pasar a centrifugar a 8 000 rpm por 1 minuto, hasta obtener el RNA viral, procediéndose a almacenar las muestras a -70°C hasta su utilización.

#### **4.1.3. RT-PCR múltiple de un fragmento del gen Cápside**

Se utilizó procedimiento descrito por Harris *et al.*, 1998 que es una adaptación de la RT-PCR descrita por Lanciotti *et al.*, 1992 que permite la identificación de los cuatro serotipos del virus dengue mediante la amplificación de una región de la Cápside.

La extracción de RNA a partir del sobrenadante de los cultivos celulares se realizó con el kit Qiaamp viral RNA (Qiagen, 2010) descrito en 4.1.2. Se añadió 5 µL del RNA viral extraído en 20 mL de una mezcla RT-PCR constituida de

Cloruro de Potasio (50 mM), Tris (10 mM, pH 8,5), gelatina 0,01%, Deoxinucleótidos Trifosfato (200 mM de cada uno), Cloruro de Magnesio (1,5 mM), Cloruro de Amonio Tetrametilo (30 mM), Betaina (0,5 M), Ditiotritol (15 mM), cebadores 5'D1 y 3'TS1 (1 mM cada uno), 3' TS2, TS3 y DENV-4 (0,5 mM de cada uno), Transcriptasa reversa *MMLV* 1U/ mL, (Invitrogen), *Taq* DNA Polimerasa 0,025 U/mL (Invitrogen).

La transcripción inversa se realizó a 42°C por 60 minutos y la amplificación de los fragmentos de DNAc se hizo mediante 40 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 1 min, y 72°C por 2 min, con una extensión final a 72°C por 5 min. La RT-PCR fue realizada en tubos 0,2 mL en termociclador MJ Research.

Para la visualización de los amplicones realizamos electroforesis horizontal. Separamos 10 µL de cada amplicón mediante un gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE (Tris-Acetato 2M, EDTA 0,05 M pH 8,3), se aplicó 120 voltios por un periodo de 45 minutos. Los tamaños de los amplicones esperados fueron: 482 pb para DENV-1, 119 bp para DENV-2, 290 bp para DENV-3, y 389 bp para DENV-4.

#### **4.2. Identificación de los genotipos y linajes para los cuatro serotipos del DENV mediante secuenciación y análisis filogenético de la unión de los genes E/NS1**

Para la identificación de los genotipos y linajes del DENV y el análisis filogenético se aplicó el flujograma descrito en anexos (Figura 14) con los siguientes procedimientos:

##### **4.2.1. RT - Nested PCR para amplificación de la unión de los genes E/NS1**

Aplicamos la RT-Nested PCR descrita por Domingo *et al.*, (2004) que amplificó un fragmento de la región E/NS1 para los cuatro serotipos del DENV del estudio, los *primers* utilizados fueron diseñados en base a las cepas prototipo (DENV-1; cepa Mochizuki, DENV-2; cepa Jamaica N-109, DENV-3;

cepa H87, DENV-4; cepa 814669) los cuales se detallan en la Tabla 12 (anexos).

La extracción de RNA a partir del sobrenadante de los cultivos celulares se realizaron con el kit Qiamp viral RNA (Qiagen, 2010) descrito en 4.1.2. La preparación de la reacción de RT-PCR requirió la adición de 5 µL del RNA viral en 45 µL del kit OneStep RT-PCR (Qiagen), la mezcla del kit contiene buffer 5x , 400 uM de cada dNTP, 20 pmol de cada primer sentido y antisentido (S1871DEN1, 1871DEN2, 1871DEN3, 1871DEN4, AS2622DEN1, AS2622DEN2, AS2622DEN3, AS2622DEN4) y enzimas Transcriptasa Reversa y Hot Star *Taq* DNA Polimerasa.

La transcripción inversa inicial fue realizada a 50°C por 45 min, desnaturalización y activación de la *Taq* Polimerasa (95°C, 15 min) y 40 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 s), hibridación (55°C, 1 min.), y extensión (72°C, 30 s), luego una extensión final a 72°C por 5 min. Una segunda amplificación (Nested PCR) fue realizada adicionando 1 µL del producto de amplificación inicial. La mezcla de reacción contuvo *buffer* (60 mM Tris-HCl pH 8.5, 2 mM) MgCl<sub>2</sub>; 15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2,5 U de *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen) y 40 pmol de cada primer sentido y antisentido (S2176DEN1, S2176DEN2, S2176DEN3, S2176DEN4, AS2504DEN). Se realizó una activación de la *Taq* Polimerasa (94°C, 2 min) y 40 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 s), hibridación (57°C, 4 min), y extensión (72°C, 30 s). La extensión final fue a 72°C por 5 min.

#### **4.2.2. Purificación del DNA de los productos obtenidos por RT – PCR mediante *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen, 2007)**

1. Se obtuvo fragmentos del DNA a partir del gel de agarosa utilizando un paño limpio y bisturí.
2. El trozo de gel fue colocado en un micro tubo y fue pesado. Se añadió 3 volúmenes de *buffer* QG a 1 volumen del gel. Para geles mayores a 2% se añadió 6 volúmenes del *buffer* QG.

3. Se realizó la incubación a 50°C durante 10 minutos (hasta que el trozo de gel se disolvió completamente). Se mezcló el tubo con ayuda de un homogeneizador cada 2 a 3 minutos para ayudar a disolver.
4. Después de que gel se disolvió completamente, se comprobó que el color de la mezcla fuese de color amarillo (similar al Buffer QG). Si el color de la mezcla estuvo entre color naranja o violeta, se añadió 10 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5,0. Se mezcló hasta obtener un color amarillo.
5. Luego se agregó 1 volumen de Isopropanol a la muestra y mezcló.
6. Colocamos una columna de centrifugación *QIAquick* en un tubo de colección de 2 mL.
7. Se centrifugó la columna por 1 min hasta que toda la muestra haya pasado a través de la columna. Se desechó el filtrado y colocó la columna de nuevo en el mismo tubo. Para los volúmenes de muestra >800 uL, repetir el proceso de cargado de muestra y centrifugado.
8. El purificado fue para utilizar en secuenciación, para lo cual añadimos 0,5 mL de tampón QG a la columna y se procedió a la centrifugación durante 1 minuto. Se desechó el filtrado y colocó la columna en el mismo tubo de colección.
9. Para el lavado, se procedió a añadir 0,75 mL de tampón PE en la columna *QIAquick* y centrifugó durante 1 minuto. Se desechó el filtrado y de nuevo se colocó la columna en el mismo tubo. Como el DNA se utilizó para secuenciación (aplicación sensible a sales), dejé en reposo la columna entre 2-3 minutos después de la adición de tampón PE.
10. Se centrifugó la columna una vez más, siempre en el tubo de colección de 2 mL durante 1 min a 17 900 x g (13 000 rpm) para eliminar tampón de lavado.
11. Colocamos la columna en un tubo de micro centrífuga limpio de 1,5 mL.
12. Para eluir el DNA, añadimos 50 µL de tampón EB (Tris.Cl, 10 mM pH 8,5) o agua en el centro de la membrana y centrifugué durante 1 minuto.
13. El DNA purificado fue analizado en un gel, para ello añadir 1 volumen de colorante a 5 volúmenes de DNA purificado. Mezclamos la solución con la pipeta antes de cargar en el gel.

#### 4.2.3. Purificación de DNA para secuenciación (Macherey – Nagel, 2010)

1. Se centrifugaron las columnas *NucleoSEQ* por 30 s a 750 x g para compactar la matriz de la columna.
2. Se añadieron 600 µL de agua destilada y se homogenizó cada columna para hidratar la matriz del gel. Se removieron las burbujas de aire mediante el vortex o golpeando ligeramente la columna. Se incubó al menos 30 para hidratar la matriz del gel a temperatura ambiente.
3. Colocamos la columna dentro de una centrífuga apropiada (las tapas de las columnas se orientó en dirección contraria al movimiento del rotor). Se centrifugó por 2 minutos a 750 x g (e.j. 3000 rpm para *Eppendorf 5115C*) para remover el buffer remanente y se descartó el tubo de colección.
4. Abrimos la tapa de la columna, cuidadosamente se colocó la muestra sobre el centro del gel resina. Pipetear la muestra a los lados del tubo de la columna podría reducir la eficiencia de la purificación. El volumen de la muestra no excedió los 20 µL.
5. Se colocó la columna en la misma orientación en la centrífuga, considerando la misma orientación mencionada arriba. Se eluyó la muestra por centrifugación de las columnas durante 4-6 min a 750 x g y se descartó la columna.
6. Cada muestra fue secada en centrífuga al vacío, se agregó 30 µL de agua libre de RNAasa para reconstituir el DNA.

#### 4.2.4. Secuenciación genética

Los productos de la Nested PCR fueron purificados con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). La secuenciación de los productos amplificados (20ng) se realizó con el kit *BigDye terminator* v. 3.1 (Applied Biosystem) según se describe en la Tabla 13 (anexos). Se realizó 4 reacciones de secuenciación por cada muestra, 2 con el *primer* sentido y 2 con el *primer* antisentido.

El termociclador se programó para un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos; seguido de 25 ciclos de 96°C por 10 s; 50°C por 5 s y 60°C por 4 minutos.

Los productos de secuenciación fueron purificados con el *Kit Centri Sep* (Princeton Separations) de acuerdo al protocolo del fabricante, utilizándose luego el secuenciador 3500xL (Applied Biosystems). Las secuencias consenso se obtuvieron a través del análisis de las secuencias sentido y antisentido de cada fragmento mediante el uso del programa BioEdit ver. 7.0.9.0 y el software *SeqMan II* (Dnastar Inc).

#### **4.2.5. Análisis filogenético**

Para el análisis filogenético se requirió la secuencia consenso de cada cepa estudiada y también se utilizó secuencias de DENV reportadas en los bancos genéticos (GenBank y DDBJ), las que están detalladas en las Tablas 14, 15, 16 y 17 (anexos). Las secuencias fueron alineadas y analizadas por cada serotipo mediante el programa Clustal X, versión 1.83 (Larkin *et al.*, 2007).

El análisis filogenético de los serotipos estudiados se realizó con el algoritmo de distancia *Neighbor Joining* (NJ) con el programa MEGA ver. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) para reconstruir el árbol filogenético, se aplicó el método Kimura 2 parámetros para calcular la sustitución nucleotídica. La evaluación de la topología encontrada se realizó con un *bootstrap* de 1000 autoréplicas.

Para realizar el análisis filogenético del genoma completo del DENV-2, se utilizó el método de *Maximum Likelihood*, la distancia evolutiva se calculó utilizando el modelo GTR –G con el programa MEGA ver. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). La evaluación de la topología encontrada se realizó con *bootstrap* de 1000 autoréplicas.

#### **4.3. Secuenciación y análisis filogenético del genoma completo de la cepa 1217776510, DENV-2, genotipo América/Asia**

A partir de la cepa 1217776510 del DENV-2, se realizó la extracción de RNA a partir del sobrenadante de los cultivos celulares con el *kit Qiamp viral RNA* (Qiagen, 2010) descrito en 4.1.2., luego se procedió a realizar la retrotranscripción a cDNA y la amplificación de 5 fragmentos sobrelapados de acuerdo a la metodología reportada (Christenbury *et al.*, 2010).

Para el proceso de purificación de los productos amplificados se aplicó los procedimientos descritos en 4.2.2 y 4.2.3; la secuenciación fue realizada de acuerdo a los procedimientos del ítem 4.2.4.

El análisis filogenético se realizó de acuerdo al ítem 4.2.5, considerando un total de 18 secuencias de genomas completos de DENV-2 reportadas en el Genbank (Tabla 17) que correspondieron a países de Sudamérica (Brasil, Colombia y Perú), Centroamérica (Nicaragua, Puerto Rico y República Dominicana), Norteamérica (México) y Asia (Tailandia). Se utilizó como grupo externo el genotipo América.

La secuencia nucleotídica del genoma completo y las secuencias previamente seleccionadas del Genbank, fueron analizadas por el método *Maximum Likelihood* con *bootstrap* de 1000 autoréplicas con matriz GTR+G para generar el árbol filogenético.

#### **4.4. Análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del fragmento E/NS1 de los cuatro serotipos del DENV**

Para realizar el análisis de las mutaciones y cambios aminoacídicos del fragmento de la unión E/NS1 de las cepas peruanas se realizó el alineamiento con el programa Clustal X, versión 1.83 (Larkin *et al.*, 2007), el análisis fue realizado utilizando el programa MEGA ver. 5.0 (Tamura k. *et al.*, 2011).

#### **4.5. Distribución de los genotipos y linajes del DENV según la región geográfica y año de aislamiento**

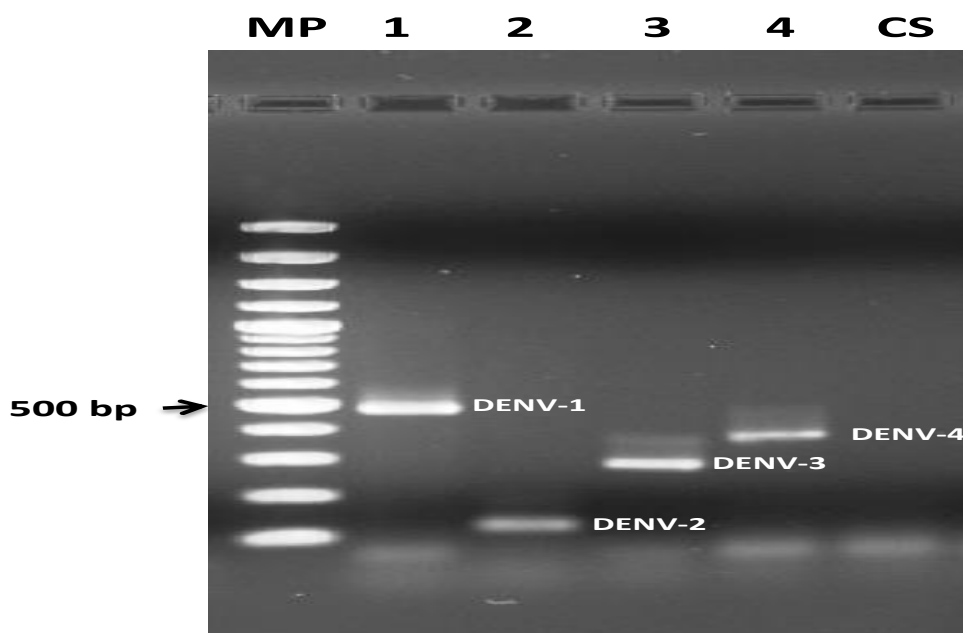
Para el establecimiento de la distribución de los genotipos y linajes de los virus dengue según área geográfica y año en que se realizó el aislamiento se diseñó tablas de distribución según serotipos.



## V. RESULTADOS

### 5.1. Identificación de los serotipos en las cepas de los virus dengue para el gen C

De las 109 cepas del DENV procesadas para la extracción del RNA viral, RT-PCR para el gen que codifica la proteína de la Cápside se identificaron los serotipos a los que pertenecen; éstos presentaron amplicones de diferentes tamaños según lo esperado: las 20 cepas del DENV-1 presentaron 482 bp, las 27 cepas del DENV-2, 119 bp, las 52 cepas del DENV-3, 290 bp y las 10 cepas del DENV-4, 389 bp (Figura 15). Se identificó el serotipo de las 109 cepas incluidas en el estudio.

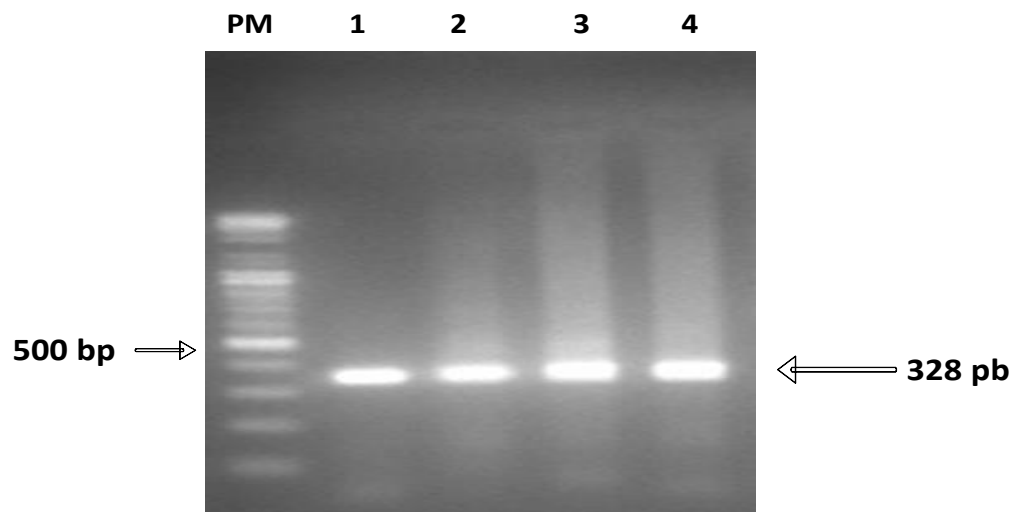


**Figura 15.** Identificación de los serotipos en las cepas de los virus dengue mediante RT-PCR que amplificó el gen C. Se utilizó marcador de peso (MP) de 100 ladder y agua como control del sistema (CS). En el carril (1) se observa DENV-1 con 482 pb, en el (2) DENV-2 con 119 pb, en el (3) DENV-3 con 290 pb y en el (4) DENV-4 con 389 pb.

### 5.2. Identificación de los genotipos y linajes para los cuatro serotipos del DENV mediante secuenciación y análisis filogenético de la unión de los genes E/NS1

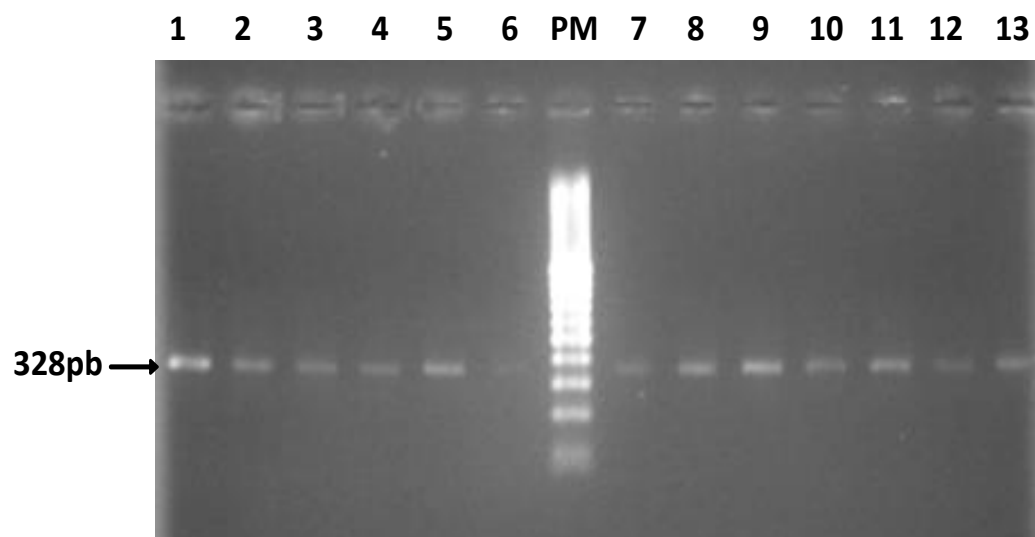
El RNA extraído de las 109 cepas del DENV, procesadas mediante RT-Nested PCR según el protocolo descrito en el ítem 4.2.1 y visualizados con

electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% presentaron productos de amplificación de 328 pb para las cuatro serotipos (Figura 16).



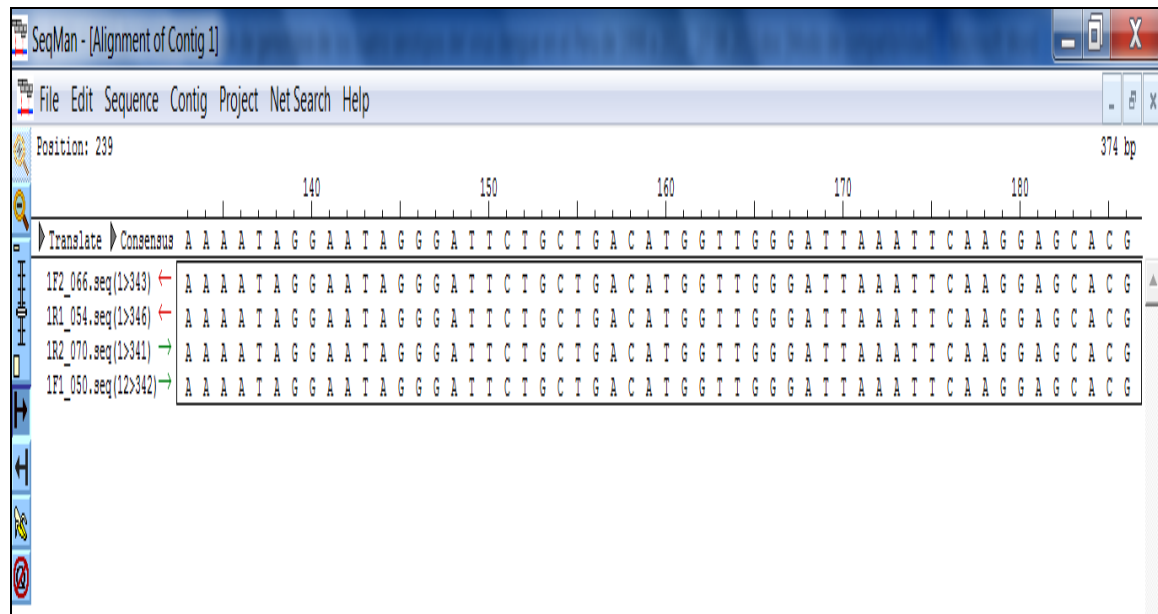
**Figura 16.** Productos de amplificación de 328 pb del fragmento E/NS1 de los cuatro serotipos del virus dengue mediante RT - Nested PCR. Se utilizó marcador de peso (MP) de 100 ladder. En el carril (1) se observa DENV-1, carril (2) DENV-2, carril (3) DENV-3 y carril (4) DENV-4.

Todos los productos amplificados fueron cortados del gel de agarosa y purificados en columna según ítem 4.2.2, se corroboró la pureza del producto realizando la electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% como se observa en la Figura 17.



**Figura 17.** Productos de amplificación de 328 pb del fragmento E/NS1 purificados mediante columna correspondiente a los cuatro serotipos del virus dengue. Se realizó electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5%, se utilizó marcador de peso (MP) de 100 ladder. Los carriles (1-3) corresponden a DENV-1, carriles (4-6) a DENV-2, carriles (7-9) a DENV-3 y carriles (10-13) a DENV-4.

Cada amplificado fue secuenciado dos veces por hebra según el ítem 4.2.4, las cuatro secuencias: 2 sentido y 2 antisentido, fueron la base para elaborar las secuencias consenso, de esta forma se garantizó la calidad de las secuencias obtenidas (Figura 18).



**Figura 18.** Secuencia consenso obtenida en una muestra analizada mediante el programa SeqMan. Para el consenso se utilizó 2 secuencias sentido y 2 antisentido.

### 5.2.1. Identificación de genotipos y linajes del DENV-1

Para la identificación de genotipos y linajes del DENV-1 se consideró 20 secuencias de DENV-1 obtenidas en este estudio durante los años 2003 al 2012 que corresponden a las regiones de Cajamarca, La libertad, Lambayeque, Lima, Madre de Dios, Piura, San Martín, Tumbes y Ucayali; también se incluyeron 17 secuencias previamente reportadas en el Genbank: 2 secuencias de Perú del año 2000 y 15 secuencias que corresponden a otros países de Centroamérica, Sudamérica y Asia.

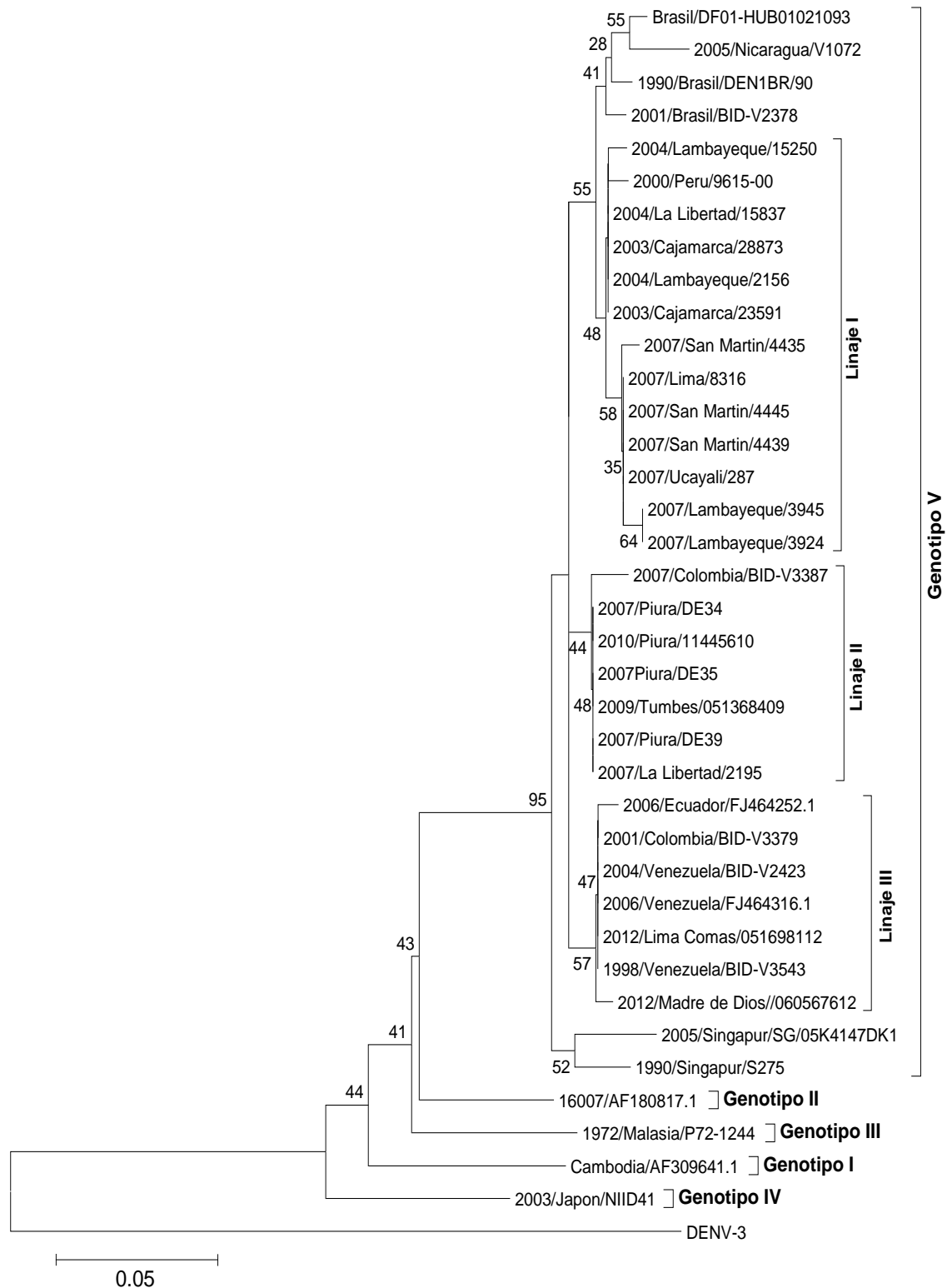
El alineamiento de las secuencias nucleotídicas del fragmento de la unión E/NS1 de las cepas en estudio y las secuencias disponibles en el Genbank, fueron sometidos al análisis filogenético mediante el algoritmo *Neighbor Joining* que agrupó a las cepas peruanas dentro del genotipo V (también denominado América/África) y presentó tres linajes a los cuales denominamos: Linaje I, II y III (Figura 19).

El linaje I agrupa cepas de los años 2000 al 2007 que corresponden a regiones de la Costa Norte del país (Piura, La Libertad, Lambayeque) y Lima, así como regiones que cuentan con áreas de selva (Cajamarca, San Martín y Ucayali). Dentro de este agrupamiento están cepas que corresponden a Brasil (1990, 2001) y Nicaragua (2005).

El linaje II agrupó las cepas de los años 2007 al 2010 que corresponden únicamente a regiones de la Costa Norte del país (La Libertad, Piura y Tumbes).

El linaje III agrupó las cepas del año 2012 que corresponden a la región Madre de Dios y Lima. Dentro de este agrupamiento están cepas que corresponden a Venezuela (1998, 2004 y 2006), Colombia (2001) y Ecuador (2006).

.



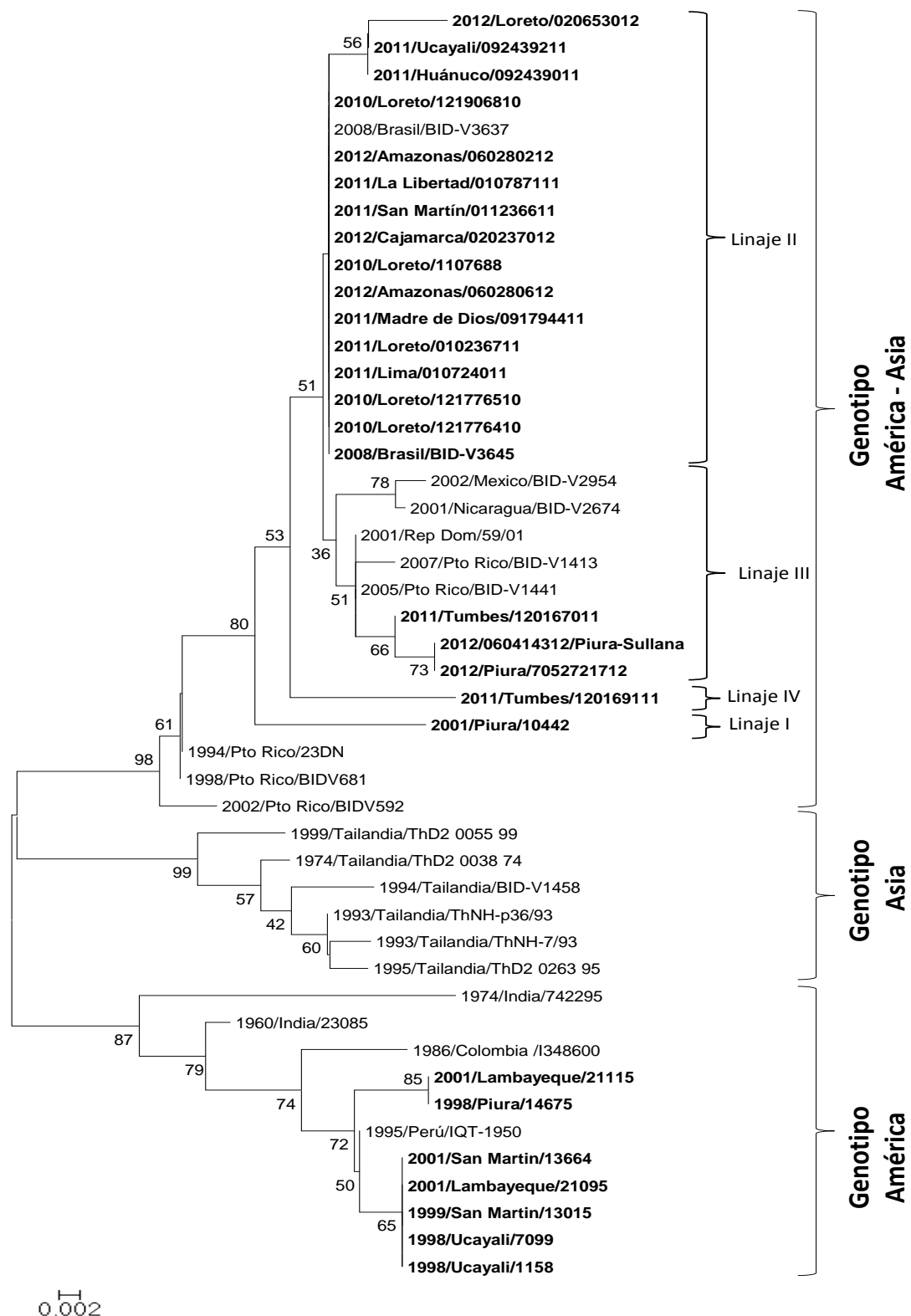
**Figura 19.** Árbol filogenético del DENV-1 obtenido mediante el algoritmo de distancia *Neighbor-Joining* con valor *bootstrap* de 1000 autoréplicas. La distancia evolutiva fue calculada utilizando el método *Kimura 2-parámetros* (programa MEGA 5.0). Se analizaron 20 secuencias genéticas de la unión E/NS1 de los DENV-1 aislados en el Perú durante los años 2003 a 2012 y 17 secuencias de otros países previamente reportadas en el Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Se consideró como grupo externo al DENV-3.

### 5.2.2. Identificación de genotipos y linajes del DENV-2

Para la identificación de genotipos y linajes del DENV-2 se consideró 27 secuencias de DENV-2 obtenidas en este estudio durante los años 1998 al 2012 que corresponden a las regiones de Amazonas, Cajamarca, Huánuco, La Libertad, Lambayeque, Lima, Loreto, Madre de Dios, Piura, San Martín, Tumbes y Ucayali; también se incluyó 20 secuencias reportadas previamente en el Genbank y DBJ: una secuencia de Perú (1995) y 19 secuencias que corresponden a otros países de Sudamérica, Centroamérica y Asia. Se consideró como grupo externo secuencias del DENV-2 genotipo Asia.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas del fragmento de la unión E/NS1 de las cepas en estudio y las secuencias obtenidas del Genbank y DDBJ, sometidos al análisis filogenético mediante el algoritmo *Neighbor Joining* agrupó las cepas peruanas dentro de dos genotipos: el genotipo América y el genotipo América-Asia (Figura 20). El genotipo América agrupó las cepas de las regiones de la selva (Iquitos, 1995; Ucayali, 1998; San Martín, 1999-2001), así como regiones de la Costa (Piura, 1998; Lambayeque, 2001). Dentro de este agrupamiento también se encontró cepas de Colombia (1986) e India (1960, 1964). El genotipo América/Asia presentó cuatro linajes a los cuales denominamos: I, II, III y IV.

El linaje I agrupó una muestra obtenida de la región Piura durante el año 2001, mientras que el linaje II agrupó las cepas de las regiones que cuentan con área selvática (Loreto, 2010, 2011, 2012; Amazonas, 2011, 2012; Cajamarca, 2012; Huánuco, 2011; Madre de Dios, 2011; San Martín, 2011, Ucayali) y la región de la costa Lima, 2011; La Libertad, 2011). Dentro de este agrupamiento también se encontró cepas de Brasil del 2008. El linaje III agrupó cepas obtenidas de la costa Norte (Tumbes 2011, Piura, 2012). En este agrupamiento también están cepas de República Dominicana (2001), Puerto Rico (2005, 2007), Nicaragua (2001) y México (2002). El linaje IV está referido a una muestra obtenida de la región Tumbes durante el año 2011.



**Figura 20.** Árbol filogenético del DENV-2 obtenido mediante el algoritmo de distancia *Neighbor-Joining* con valor bootstrap de 1000 autoréplicas. La distancia evolutiva fue calculada utilizando el método *Kimura 2-parámetros* (programa MEGA 5.0). Se analizaron 27 secuencias genéticas de la unión E/NS1 de los DENV-2 aislados en el Perú durante los años 1998 a 2012 y 20 secuencias previamente reportadas en el Genbank y DDBJ. Se consideró como grupo externo al DENV-2 genotipo América.

### 5.2.3. Identificación de genotipos y linajes del DENV-3

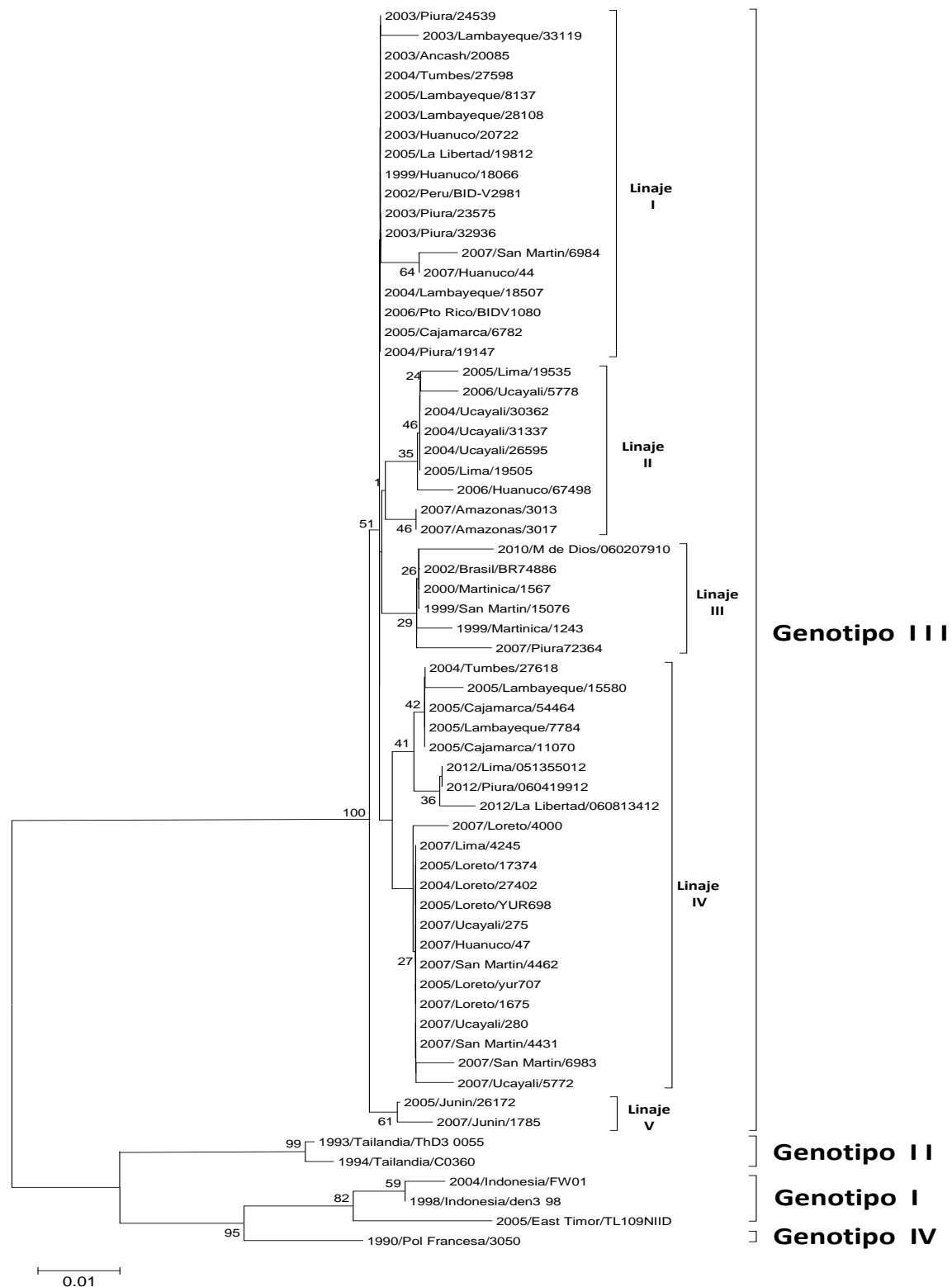
Para la identificación de genotipos y linajes del DENV-3 se consideró 52 secuencias de DENV-3 obtenidas en este estudio de aislados obtenidos durante los años 1999 al 2012 que correspondieron a las regiones de Amazonas, Ancash, Cajamarca, Huánuco, Junín, La Libertad, Lambayeque, Lima, Loreto, Madre de Dios, Piura, San Martín, Tumbes y Ucayali; también se incluyó 10 secuencias previamente reportadas en el Genbank. El grupo externo al DENV-3 genotipo IV.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas del fragmento de la unión E/NS1 de las cepas en estudio y las secuencias disponibles en el Genbank, sometidos al análisis filogenético mediante el algoritmo *Neighbor Joining* agrupó las cepas peruanas dentro del genotipo III y presentó cinco linajes a los cuales denominamos: I, II, III, IV y V (Figura 21).

El linaje I agrupó las cepas de los años 1999 al 2006 que corresponden a regiones de la Costa Norte del país (Ancash, La libertad, Lambayeque y Piura) así como aquellas regiones que cuentan con áreas selváticas (Cajamarca y Huánuco); dentro de este agrupamiento se encontró una cepa de Puerto Rico (2006). Por otro lado, el linaje II agrupó las cepas de los años 2004 al 2007 que corresponden a la región Lima (2005) y regiones de la selva (Amazonas, Huánuco y Ucayali), mientras que, el linaje III agrupó las cepas de los años 1999 al 2010 que corresponden a regiones de la Selva (San Martín, 1999; Madre de Dios, 2010) y Piura, 2007. Dentro de este agrupamiento se encuentran cepas de Brasil (2002) y Martinica (2000).

Respecto al linaje IV, agrupó las cepas de los años 2004 al 2012 y las dividió en dos subgrupos: En el primer subgrupo se encuentran las cepas de Cajamarca, La libertad, Lambayeque, Lima, Piura y Tumbes; en el segundo subgrupo se encuentran las cepas Huánuco, Lima, San Martín, Loreto y Ucayali, mientras que, el linaje V agrupó las cepas de los años 2005 y 2007 que corresponden a la región Junín.





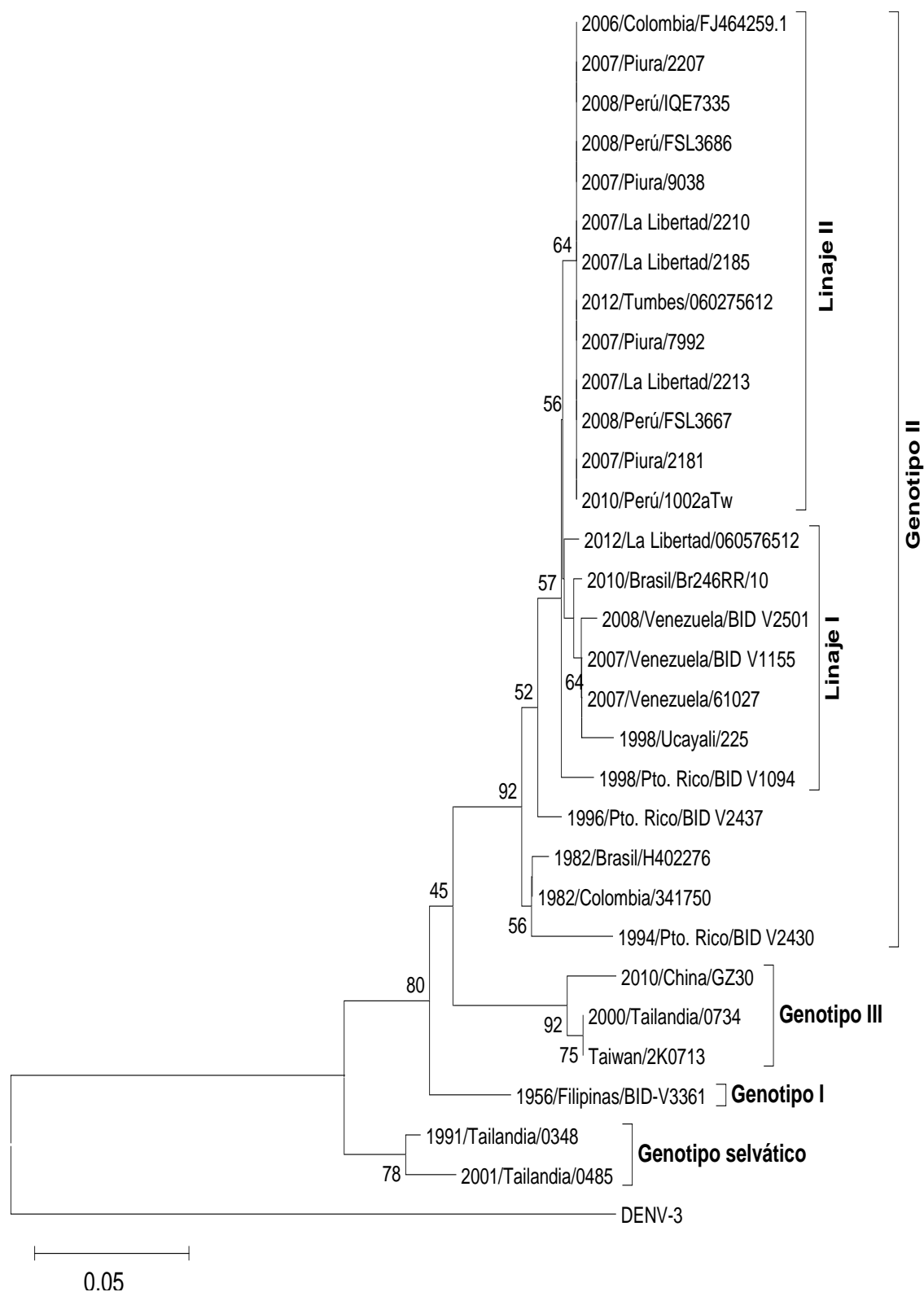
**Figura 21.** Árbol filogenético del DENV-3 obtenido mediante el algoritmo de distancia *Neighbor-Joining* con valor bootstrap de 1000 autoréplicas. La distancia evolutiva fue calculada utilizando el método *Kimura 2-parámetros* (programa MEGA 5.0). Se analizaron 52 secuencias de la unión E/NS1 de los DENV-3 aislados en el Perú durante los años 1999 a 2012 y diez secuencias previamente reportadas en el Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Se consideró como grupo externo DENV-3 genotipo IV.

#### 5.2.4. Identificación de genotipos y linajes del DENV-4

Para la identificación de genotipos y linajes del DENV-4 se consideró 10 secuencias de DENV-4 obtenidas en este estudio de aislados obtenidos durante los años 1998 al 2012 que correspondieron a las regiones de La libertad, Piura, Tumbes y Ucayali, así como 20 secuencias reportadas previamente en el Genbank: 4 secuencias de Perú y 16 secuencias que correspondieron a otros países de Centroamérica, Sudamérica y Asia. Se consideró como grupo externo al DENV-3.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas del fragmento de la unión E/NS1 para las cepas en estudio y las secuencias previamente obtenidas del Genbank, sometido al análisis filogenético mediante el algoritmo *Neighbor Joining* agrupó las cepas peruanas dentro del Genotipo II y presentó dos linajes a los que denominamos I y II (Figura 22).

El linaje I agrupó la cepa del año 1998 que corresponde a la región Ucayali con las cepas de Venezuela (2007 y 2008), así como una cepa del año 2012 que corresponde a la región de La Libertad (060576512), dentro de este agrupamiento se encuentran una cepa de Brasil del 2010. Mientras que el linaje II agrupó las cepas de los años 2007 al 2012 que corresponde a las regiones de La Libertad y Piura (2007) y Tumbes (2012). Dentro de este agrupamiento se encontró cepas previamente reportadas en el Genbank: tres cepas de Loreto (IQE7335, FSL3686, FSL3667) del año 2008, una cepa reportada el 2010 (1002aTw) y una cepa de Colombia (FJ464259.1) del 2006.



**Figura 22.** Árbol filogenético del DENV-4 obtenido mediante el algoritmo de *Neighbor-Joining* con valor bootstrap de 1000 autoréplicas. La distancia evolutiva fue calculada utilizando el método *Kimura 2-parámetros* (programa MEGA 5.0). Se analizaron 10 secuencias genéticas de la unión E/NS1 de los DENV-4 aislados en el Perú durante los años 1998 a 2012 y 19 secuencias previamente reportadas en el Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Se consideró como grupo externo DENV-3.

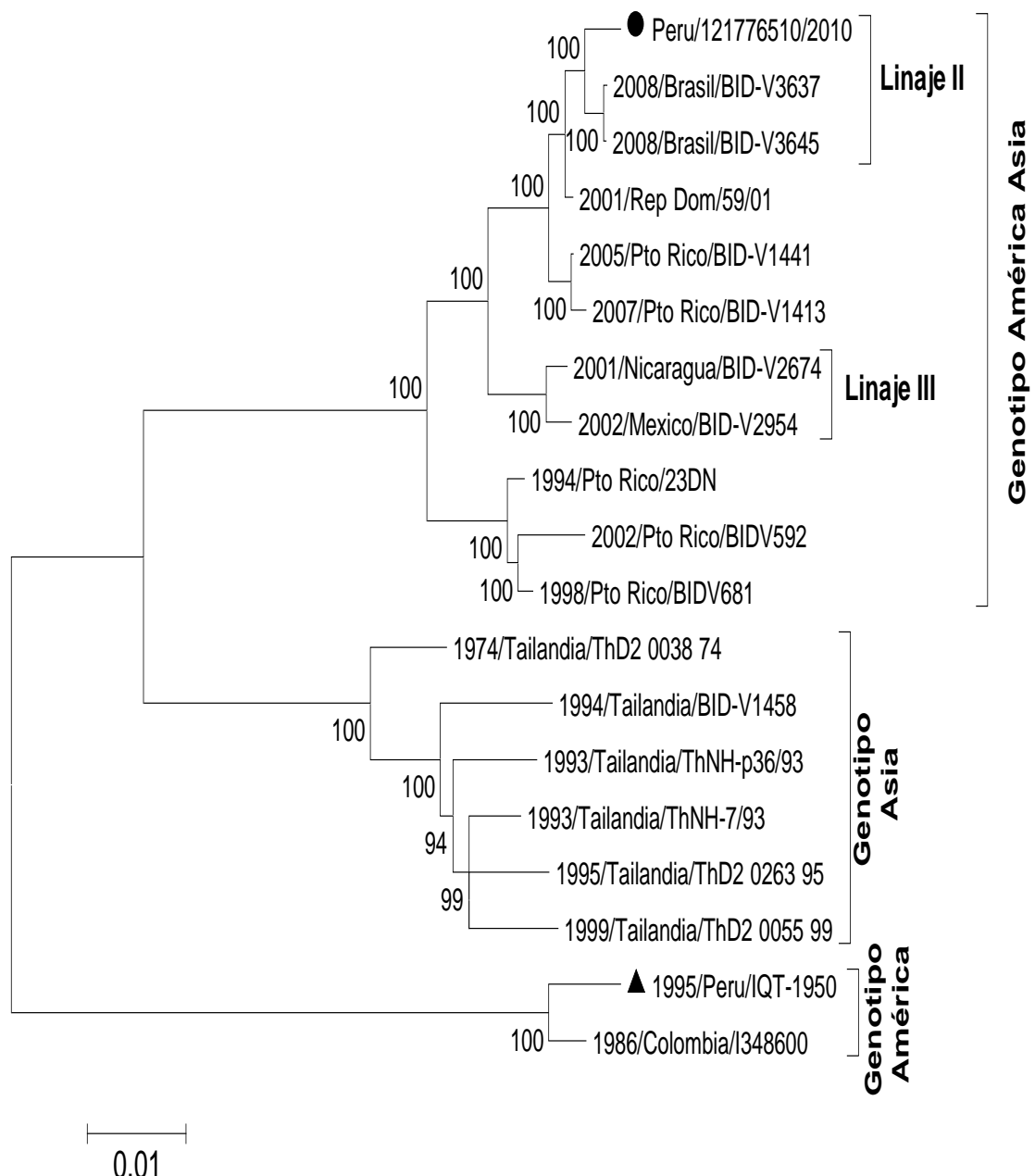
### 5.3. Secuenciación y análisis filogenético del genoma completo de la cepa 121776510, DENV-2, genotipo América/Asia

La secuenciación nucleotídica del genoma completo de la cepa código 121776510 para el virus DENV-2 genotipo América/Asia generó una secuencia de 10 518 nucleótidos. El alineamiento de las secuencias secuencia en estudio y 18 secuencias del DENV-2 previamente reportadas en el Genbank, sometidas al análisis por el método *Maximum Likelihood* con 1000 autoréplicas con la matriz GTR –G generaron un árbol filogenético agrupando la cepa 121776510 con cepas de Brasil, BID-V3637 y BD-V3645. Los valores *bootstrap* fueron superiores a 90 para todos clados generados (Figura 23).

El análisis entre la cepa de estudio y la más cercana por homología (Brasil, BID-V3637) reportó 56 cambios nucleotídicos y 8 cambios aminoacídicos en las posiciones 1074, 2060, 2782, 3326, 3389, 3419, 3420, 3438 (Tabla 18), todos los cambios se detectaron en las proteínas no estructurales del virus.

**Tabla 18.** Comparación de sitios variables de las secuencias aminoacídicas de la cepa 121776510, DENV-2 y cepa de Brasil BID-V3637.

	Nº de posición aminoacídica							
	1	2	2	3	3	3	3	3
	0	0	7	3	3	4	4	4
	7	6	9	2	8	1	2	3
	4	0	2	6	9	9	0	8
Peru/121776510/2010	M	R	V	V	I	R	P	T
2008/Brasil/BID-V3637	I	K	I	A	M	G	L	A



**Figura 23.** Árbol filogenético del DENV-2 obtenido mediante el método *Maximum Likelihood* con valor *bootstrap* de 1000 autoréplicas. La distancia evolutiva fue calculada utilizando la matriz GTR –G (programa MEGA 5.0). Se analizó las secuencias de los genomas completos de la cepa 121776510 y 18 secuencias previamente reportadas en el Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Se consideró como grupo externo al DENV-2 genotipo América.

#### 5.4. Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de los

## fragmentos E/NS1 para los cuatro serotipos del DENV

### 5.4.1. Análisis nucleotídico y aminoacídico de los fragmentos E/NS1 del DENV-1

Se encontró 9 cambios nucleotídicos en los fragmentos de 220 pb de E/NS1 del DENV-1. El linaje I presentó cambios en la posición 17, 65, 179; el linaje II en 8, 126 y 194; y el linaje III en 8, 29, 83, 194 (Tabla 19). El análisis aminoacídico reportó 8 cambios, el linaje I presentó cambios en 6, 22 y 60; linaje II, en 3, 63, 65; y linaje III en 3, 28, 65 (Tabla 20).

La cepa más variable de todas las analizadas fue 2012/Madre de Dios/060567612 con cuatro cambios nucleotídicos y aminoacídicos, respectivamente.

**Tabla 19.** Comparación de los sitios variables de las secuencias nucleotídicas del fragmento E/NS1 del DENV-1, de la posición 5 a 194. Se analizaron 220 pb de 20 secuencias de diferentes regiones mediante el programa MEGA 5.0

	Nº de posición nucleotídica								
		1	2	6	8	1	1	1	1
	8	7	9	5	3	6	9	8	4
2003/Cajamarca/23591	C	A	A	C	C	C	T	C	T
2007Piura/DE35	T	.	.	.	.	T	.	.	C
2009/Tumbes/051368409	T	.	.	.	.	T	.	.	C
2007/Piura/DE39	T	.	.	.	.	T	.	.	C
2012/Madre de Dios//060567612	T	.	T	.	T	.	.	.	C
2012/Lima Comas/051698112	T	.	.	.	T	.	.	.	C
2007/San Martín/4439	.	.	.	.	.	.	C	.	.
2004/La Libertad/15837	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2007/Ucayali/287	.	.	.	.	.	.	C	.	.
2007/Lima/8316	.	.	.	.	.	.	C	.	.
2007/San Martín/4445	.	.	.	.	.	.	C	.	.
2007/Lambayeque/3924	.	G	.	.	.	.	C	.	.
2007/Lambayeque/3945	.	G	.	.	.	.	C	.	.
2007/San Martín/4435	.	.	.	A	.	.	C	.	.
2007/Piura/DE34	T	.	.	.	.	T	.	.	C
2007/La Libertad/2195	T	.	.	.	.	T	.	.	C
2010/Piura/11445610	T	.	.	.	.	T	.	.	C
2004/Lambayeque/2156	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2004/Lambayeque/15250	.	.	.	.	.	.	.	T	.
2003/Cajamarca/28873	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**Tabla 20.** Comparación de los sitios variables de las secuencias aminoacídicas

del fragmento E/NS1 del DENV-1, de la posición 3 al 65. Se analizaron 220 pb de 20 secuencias de diferentes regiones mediante el programa MEGA 5.0

	Nº de posición aminoacídica						
	1	2	2	6	6	6	
	3	6	0	2	8	0	3 5
2003/Cajamarca/23591	A	E	H	P	S	L	A L
2007/Piura/DE35	V	.	.	.	.	.	S
2009/Tumbes/051368409	V	.	.	.	.	.	S
2007/Piura/DE39	V	.	.	.	.	.	S
2012/Madre de Dios//060567612	V	.	L	.	L	.	S
2012/Lima Comas/051698112	V	.	.	.	L	.	S
2007/San Martín/4439	.	.	.	.	.	S	.
2004/La Libertad/15837	.	.	.	.	.	.	.
2007/Ucayali/287	.	.	.	.	.	S	.
2007/Lima/8316	.	.	.	.	.	S	.
2007/San Martín/4445	.	.	.	.	.	S	.
2007/Lambayeque/3924	.	G	.	.	.	S	.
2007/Lambayeque/3945	.	G	.	.	.	S	.
2007/San Martín/4435	.	.	.	Q	.	S	.
2007/Piura/DE34	V	.	.	.	.	.	S
2007/La Libertad/2195	V	.	.	.	.	.	S
2010/Piura/11445610	V	.	.	.	.	.	S
2004/Lambayeque/2156	.	.	.	.	.	.	.
2004/Lambayeque/15250	.	.	.	.	.	V	.
2003/Cajamarca/28873	.	.	.	.	.	.	.

#### 5.4.2. Análisis nucleotídico y aminoacídico de los fragmentos E/NS1 del DENV-2

Se encontró 33 cambios nucleotídicos en los fragmentos de 220 pb de E/NS1 del DENV-2 (Tabla 21). El genotipo América presentó cambios en las posiciones 11, 23, 32, 41, 53, 54, 59, 71, 80, 83,92, 107, 122, 146, 149, 152, 158, 173, 176, 180, 182, 189, 204 y 211. Los cambios nucleotídicos para el genotipo América/Asia fueron: Linaje I en 12, 33, 50, 54, 128, 173, 179, 180, 211; linaje II en 50, 54, 180, 189, 210 y 212; linaje III en 54; linaje IV en 50, 54, 152, 155, 173, 176, 180, 197. El análisis aminoacídico reportó 24 cambios (Tabla 22), de éstos, 16 correspondieron al genotipo América, los cambios para el genotipo América/Asia linaje I fueron en las posiciones 17, 43, 58,60 ; para el linaje II los

cambios fueron en las posiciones 17, 70, 71; para el linaje IV los cambios fueron en las posiciones 17, 51, 52, 58, 66.

**Tabla 21.** Comparación de los sitios variables de las secuencias nucleotídicas del fragmento E/NS1 del DENV-2, de la posición 11 al 212. Se analizaron 220 pb de 27 secuencias de diferentes regiones mediante el programa MEGA 5.0.

	Nº de posición nucleotídica																																		
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2				
	1	1	2	3	3	4	5	5	5	5	7	8	8	9	0	2	2	4	4	5	5	5	7	7	7	8	8	8	9	0	1	1	1		
	1	2	3	2	3	1	0	3	4	9	1	0	3	2	7	2	8	6	9	2	5	8	3	6	9	0	2	9	7	4	0	1	2		
2012/060414312/Piura Sullana	C	C	G	T	A	G	C	A	A	C	T	T	T	C	A	C	C	T	A	T	C	C	G	A	A	C	G	G	A	C	G	C	T		
2011/Tumbes/120167011	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
2001/San Martín/13664	T	.	.	A	.	A	.	G	G	.	C	A	C	T	G	T	.	C	G	C	.	A	A	G	.	T	A	A	.	T	.	T	.		
2012/Piura/7052721712	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
2001/Lambayeque/21095	T	.	.	A	.	A	.	G	G	.	C	A	C	T	G	T	.	C	G	C	.	A	A	G	.	T	A	A	.	T	.	T	.		
2001/Lambayeque/21115	T	.	A	A	.	A	.	G	G	T	C	A	C	T	G	T	.	C	.	C	.	A	A	G	.	T	A	A	.	T	.	T	.		
1999/San Martín/13015	T	.	.	A	.	A	.	G	G	.	C	A	C	T	G	T	.	C	G	C	.	A	A	G	.	T	A	A	.	T	.	T	.		
2010/Loreto/121776410	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
2011/Huánuco/092439011	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	
1998/Ucayali/7099	T	.	.	A	.	A	.	G	G	.	C	A	C	T	G	T	.	C	G	C	.	A	A	G	.	T	A	A	.	T	.	T	.		
2011/Tumbes/120169111	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	A	G	.	T	.	G	.
1998/Piura/14675	T	.	A	A	.	A	.	G	G	T	C	A	C	T	G	T	.	C	.	C	.	A	A	G	.	T	A	A	.	T	.	T	.		
2001/Piura/10442	.	T	.	.	T	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	T	.	.	.	.	T	.	
2010/Loreto/121776510	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
2011/Lima/010724011	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
2011/Loreto/010236711	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
1998/Ucayali/1158	T	.	.	A	.	A	.	G	G	.	C	A	C	T	G	T	.	C	G	C	.	A	A	G	.	T	A	A	.	T	.	T	.		
2011/Madre de Dios/091794411	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
2012/Amazonas/060280612	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
2012/Loreto/020653012	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	C	.	C	.	
2010/Loreto/1107688	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
2012/Jaén/020237012	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
2011/San Martín/011236611	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
2011/La Libertad/010787111	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
2012/Amazonas/060280212	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
2010/Loreto/121906810	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	
2011/Ucayali/092439211	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	

**Tabla 22.** Comparación de sitios variables de las secuencias aminoacídicas del fragmento E/NS1 del DENV-2, de la posición 4 al 71. Se analizaron 220 pb de 27 secuencias de diferentes regiones mediante el programa MEGA 5.0.



	Nº de posición aminoacídica																							
	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	4	4	4	5	5	5	5	5	6	6	7	7		
	4	8	1	4	7	8	0	4	7	8	1	6	1	3	9	0	1	2	3	8	0	6	0	1
2012/060414312/Piura Sullana	P	C	L	R	T	K	S	M	L	L	S	K	S	S	I	H	V	A	P	R	Y	H	E	L
2011/Tumbes/120167011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2001/San Martín/13664	L	.	Q	K	.	R	.	T	H	S	F	R	L	.	T	R	A	.	H	H	.	.	.	.
2012/Piura/7052721712	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2001/Lambayeque/21095	L	.	Q	K	.	R	.	T	H	S	F	R	L	.	T	R	A	.	H	H	.	.	.	.
2001/Lambayeque/21115	L	Y	Q	K	.	R	L	T	H	S	F	R	L	.	T	.	A	.	H	H	.	.	.	.
1999/San Martín/13015	L	.	Q	K	.	R	.	T	H	S	F	R	L	.	T	R	A	.	H	H	.	.	.	.
2010/Loreto/121776410	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2011/Huánuco/092439011	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1998/Ucayali/7099	L	.	Q	K	.	R	.	T	H	S	F	R	L	.	T	R	A	.	H	H	.	.	.	.
2011/Tumbes/120169111	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	V	.	H	.	R	.	.
1998/Piura/14675	L	Y	Q	K	.	R	L	T	H	S	F	R	L	.	T	.	A	.	H	H	.	.	.	.
2001/Piura/10442	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	H	C	.	.	.	.
2010/Loreto/121776510	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2011/Lima/010724011	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2011/Loreto/010236711	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1998/Ucayali/1158	L	.	Q	K	.	R	.	T	H	S	F	R	L	.	T	R	A	.	H	H	.	.	.	.
2011/Madre de Dios/091794411	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2012/Amazonas/060280612	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2012/Loreto/020653012	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D P
2010/Loreto/1107688	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2012/Jaén/020237012	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2011/San Martín/011236611	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2011/La Libertad/010787111	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2012/Amazonas/060280212	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2010/Loreto/121906810	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2011/Ucayali/092439211	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

#### 5.4.3. Análisis nucleotídico y aminoacídico de los fragmentos E/NS1 del DENV-3

Se encontró 19 cambios nucleotídicos en los fragmentos de 220 pb de E/NS1 del DENV-3. El linaje I presentó cambios en la posición 2, 177 182, 197, 203; linaje II en 2, 47, 209; linaje III en 2, 38, 110, 157 197, 206; linaje IV en 2, 17, 78, 110, 141, 152, 182, 194, 197, 215; linaje V en 2, 84, 161, 197 (Tabla 23). El análisis aminoacídico reportó 13 cambios, el linaje I presentó cambios en 1, 61, 66 y 68; linaje II en 1, 16, 70; linaje III en 1, 13, 37, 53, 66; linaje IV en 1, 6, 37, 51, 61, 65, 66; linaje V en 1, 54, 66 (Tabla 24).

**Tabla 23.** Comparación de los sitios variables de las secuencias nucleotídicas del fragmento E/NS1 del DENV-3, de la posición 2 al 215. Se analizaron 220 pb de 52 secuencias de diferentes regiones mediante el programa MEGA 5.0

	Nº de posición nucleotídica																			
	1	3	4	7	8	1	4	5	5	6	7	8	9	9	0	0	0	0	1	
	2	7	8	7	8	4	0	1	2	7	1	7	2	4	7	3	6	9	5	
2006/Huánuco/67498	T	T	C	G	C	A	T	T	A	C	C	A	G	T	G	T	G	A	G	
2012/Lima/051355012	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	
2012/Piura/060419912	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	
2012/La Libertad/060813412	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	C	A	.	.	.	.	
2007/Amazonas/3017	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2007/Amazonas/3013	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2007/Loreto/4000	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
1999/San Martín/15076	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2005/Cajamarca/11070	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	
2007/Ucayali/275	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2007/Loreto/1675	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2007/Lima/4245	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2007/San Martín/4462	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2005/Loreto/YUR698	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2006/Ucayali/5778	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	
2004/Ucayali/26595	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
2007/Huánuco/44	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2005/Loreto/17374	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2004/Piura/19147	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2005/Lambayeque/15580	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	C	.	.	.	
2005/La Libertad/19812	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2007/Ucayali/5772	C	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2004/Tumbes/27618	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	
2004/Tumbes/27598	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2003/Piura/23575	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2004/Ucayali/30362	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
2005/Lambayeque/7784	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	
2007/San Martín/4431	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2010/Madre de Dios/060207910	C	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	
2007/San Martín/6983	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	A	
2003/Piura/32936	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2004/Ucayali/31337	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
2003/Ancash/20085	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2004/Lambayeque/18507	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2005/Lambayeque/8137	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2005/Lima/19535	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
2005/Lima/19505	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
2007/Ucayali/280	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2007/Huánuco/47	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
1999/Huánuco/18066	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2005/Cajamarca/54464	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	
2005/Loreto/yur707	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2007/Junín/1785	C	.	.	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2005/Junín/26172	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2005/Cajamarca/6782	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2007/San Martín/6984	C	.	.	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2004/Loreto/27402	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2007/Piura72364	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2003/Lambayeque/33119	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.	.	.	
2003/Huánuco/20722	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2003/Piura/24539	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	
2003/Lambayeque/28108	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	

**Tabla 24.** Comparación de los sitios variables de las secuencias aminoacídicas del fragmento E/NS1 del DENV-3, de la posición 1 al 70. Se analizaron 220 pb de 52 secuencias de diferentes regiones mediante el programa MEGA 5.0.

	Nº de posición aminoacídica												
	1	1	3	5	5	5	6	6	6	6	7		
	1	6	3	6	7	1	3	4	1	5	6	8	0
2006/Huánuco/67498	I	V	A	C	L	K	H	P	R	L	R	I	E
2012/Lima/051355012	T	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	H	.	.
2012/Piura/060419912	T	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	H	.	.
2012/La Libertad/060813412	T	.	.	.	.	.	.	.	Q	S	H	.	.
2007/Amazonas/3017	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2007/Amazonas/3013	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2007/Loreto/4000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
1999/San Martín/15076	T	.	.	.	S	.	.	.	.	.	H	.	.
2005/Cajamarca/11070	T	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	H	.	.
2007/Ucayali/275	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2007/Loreto/1675	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2007/Lima/4245	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2007/San Martín/4462	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2005/Loreto/YUR698	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2006/Ucayali/5778	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
2004/Ucayali/26595	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2007/Huánuco/44	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2005/Loreto/17374	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2004/Piura/19147	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2005/Lambayeque/15580	T	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	H	T	.
2005/La Libertad/19812	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2007/Ucayali/5772	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2004/Tumbes/27618	T	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	H	.	.
2004/Tumbes/27598	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2003/Piura/23575	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2004/Ucayali/30362	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2005/Lambayeque/7784	T	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	H	.	.
2007/San Martín/4431	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2010/Madre de Dios/060207910	T	.	V	.	S	.	.	.	.	.	H	.	.
2007/San Martín/6983	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2003/Piura/32936	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2004/Ucayali/31337	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2003/Ancash/20085	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2004/Lambayeque/18507	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2005/Lambayeque/8137	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2005/Lima/19535	T	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2005/Lima/19505	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2007/Ucayali/280	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2007/Huánuco/47	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
1999/Huánuco/18066	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2005/Cajamarca/54464	T	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	H	.	.
2005/Loreto/yur707	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2007/Junín/1785	T	.	.	.	.	.	.	L	.	.	H	.	.
2005/Junín/26172	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2005/Cajamarca/6782	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2007/San Martín/6984	T	.	.	.	R	.	.	.	.	.	H	.	.
2004/Loreto/27402	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2007/Piura72364	.	.	.	S	.	Y	.	.	.	.	H	.	.
2003/Lambayeque/33119	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2003/Huánuco/20722	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2003/Piura/24539	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.
2003/Lambayeque/28108	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.

#### 5.4.4. Análisis nucleotídico y aminoacídico de los fragmentos E/NS1 del DENV-4

Se encontró 5 cambios nucleotídicos que se indican en la Tabla 25. El linaje I presentó cambios en 77, 104, 111, 188, 218. El análisis aminoacídico reportó 4 cambios referidos al linaje I en 26, 35, 63 y 73 (Tabla 26).

**Tabla 25.** Comparación de los sitios variables de las secuencias nucleotídicas del fragmento E/NS1 del DENV-4, de la posición 77 al 218. Se analizaron 220 pb de 10 secuencias de diferentes regiones mediante el programa MEGA 5.0.

	Nº de posición nucleotídica				
	1	1	1	2	
	7	0	1	8	1
	7	4	1	8	8
2007/Perú/9038	T	T	C	A	T
2007/Perú/7992	.	.	.	.	.
2012/La Libertad/060576512	C	C	.	.	.
2012/Tumbes/060275612	.	.	.	.	.
2007/Perú/2207	.	.	.	.	.
2007/La Libertad/2185	.	.	.	.	.
2007/Perú/2181	.	.	.	.	.
2007/La Libertad/2213	.	.	.	.	.
2007/La Libertad/2210	.	.	.	.	.
1998/Ucayali/225	C	.	T	T	C

**Tabla 26.** Comparación de los sitios variables de las secuencias aminoacídicas del fragmento E/NS1 del DENV-4, de la posición 26 al 73. Se analizaron 220 pb de 10 secuencias de diferentes regiones mediante el programa MEGA 5.0.

	Nº de posición aminoacídica			
	2	3	6	7
	6	5	3	3
2007/Perú/9038	L	L	E	F
2007/Perú/7992	.	.	.	.
2012/La Libertad/060576512	P	S	.	.
2012/Tumbes/060275612	.	.	.	.
2007/Perú/2207	.	.	.	.
2007/La Libertad/2185	.	.	.	.
2007/Perú/2181	.	.	.	.
2007/La Libertad/2213	.	.	.	.
2007/La Libertad/2210	.	.	.	.
1998/Ucayali/225	P	.	V	S

## 5.5. Distribución de los genotipos y linajes del DENV según la región geográfica y año de aislamiento.

El genotipo V del DENV-1 presenta tres linajes distribuidos a través del tiempo. Los linajes I y II circularon de 2003 a 2010 y el linaje III circuló el 2012 (Tabla 27).

**Tabla 27.** Distribución del genotipo V y linajes del DENV-1 según la región geográfica y año de aislamiento.

Región	Año de aislamiento y linajes														
	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Cajamarca						I									
La Libertad							I			II					
Lambayeque							I			I					
Lima										I					III
Madre de Dios															III
Piura										II			II		
San Martín										I					
Tumbes												II			
Ucayali										I					

El DENV-2, genotipo América con dos linajes circuló desde 1998 al 2001, el genotipo América/Asia, linaje I circuló el 2001, los linajes II, III y IV circularon el 2010 a 2012 (Tabla 28).

**Tabla 28.** Distribución de los genotipos y linajes del DENV-2 según región geográfica y año de aislamiento.

Región	Genotipo	Año de aislamiento y linajes														
		1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Amazonas	A/A															II
Cajamarca	A/A															II
Huánuco	A/A														II	
La Libertad	A/A														II	
Lambayeque	A				I, II											
Lima	A/A														II	
Loreto	A/A													II	II	II
Madre de Dios	A/A														II	
Piura	A	I														
	A/A				I											III
San Martín	A		II		II											
	A/A														II	
Tumbes	A/A														III, IV	
Ucayali	A	II														
	A/A														II	

El DENV-3, genotipo III, linaje I circuló de 1999 a 2001, linaje II circuló de 2004 a 2007, linaje III circuló de 1999 a 2010, linaje IV de 2004 a 2012 y linaje V de 2005 a 2007 focalizado en Junín (Tabla 29).

**Tabla 29.** Distribución de los linajes del genotipo III del DENV-3 según región geográfica y año de aislamiento.

Región	Genotipo	Año de aislamiento y linajes														
		1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Amazonas	III									II						
Ancash	III					I										
Cajamarca	III							I, IV								
Huánuco	III	I				I			II	IV						
Junín	III							V		V						
La Libertad	III							I							IV	
Lambayeque	III					I	I	I, IV								
Lima	III							II		IV					IV	
Loreto	III						IV	IV		IV						
Madre de Dios	III												III			
Piura	III					I	I			III						
San Martín	III	III								I, IV						
Tumbes	III							I, IV								
Ucayali	III						II		II	IV						

En cuanto a la distribución por área geográfica y año de aislamiento del genotipo III del DENV-4, el linaje I circuló en 1998 en Ucayali y el 2012 en La

libertad; el linaje II circuló de 2007 en La libertad y Piura, en 2012 en Piura y Tumbes (Tabla 30).

**Tabla 30.** Distribución de los genotipos y linajes del DENV-4 según región geográfica y año de aislamiento.

Región	Genotipo	Año de aislamiento y linajes														
		1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
La Libertad	II										II					I
Piura	II										II					II
Tumbes	II															II
Ucayali	II	I														

## VI. DISCUSIÓN

El dengue como enfermedad re-emergente ha captado la atención de los servicios de salud en el mundo debido a la presencia de brotes epidémicos asociado a casos graves y fatales. En el Perú, a partir del primer brote de dengue hemorrágico ocurrido en la costa Norte por la variante genotípica del DENV-2 América/Asia del año 2001, tuvo la necesidad de implementar la vigilancia del ingreso de nuevas variantes genéticas del DENV pues se evidenció la asociación de variantes genéticas del virus y casos graves de la enfermedad (Montoya *et al.*, 2003; Mostorino *et al.*, 2001).

El ingreso y circulación de los cuatro serotipos se ha dado en diferentes momentos a partir de 1990 y se observa la alternancia en algunos años, desplazando un serotipo a otro, pero, a partir del 2010 a la fecha se evidencia la circulación de los cuatro serotipos en forma permanente.

Los estudios de identificación y caracterización molecular del virus dengue son la base para la vigilancia de genotipos, de forma que se puede establecer los patrones de dispersión que se dan fácilmente debido al transporte moderno que proveen un mecanismo eficiente para la dispersión de los virus en el país y en el mundo (Wilder-Smith *et al.*, 2008).

Los métodos de secuenciación nucleotídica y análisis filogenéticos se utilizan ampliamente para explicar las relaciones genéticas entre los diferentes aislamientos virales para establecer la epidemiología. La secuenciación nucleotídica del fragmento E/NS1 establece la relación genética de los cuatro serotipos del DENV aislados en diversas regiones del país y permite realizar una clasificación por genotipos y dentro de este, los linajes (Rico-Hesse *et al.*, 2003).

La nomenclatura de los 22 genotipos del DENV es frecuentemente determinada mediante la secuenciación del gen de Envoltura de 1485 nucleótidos. Sin embargo, la secuenciación de un fragmento de 220 nt de la unión del gen E y NS1 constituye una alternativa accesible y útil para vigilar



serotipos y genotipos, como fue previamente demostrado (Rico-Hesse *et al.*, 1990; Chungue *et al.*, 1993; Domingo *et al.*, 2011).

La metodología aplicada fue previamente validada al agrupar secuencias de virus dengue en clados determinados para genotipos, si bien los valores *bootstrap* hallados para la regiones analizadas de 220 bp fueron variables, permiten diferenciar los genotipos del DENV (Domingo *et al.*, 2004).

## **6.1. Identificación los genotipos y linajes para los cuatro serotipos del DENV mediante secuenciación y análisis filogenético de la unión de los genes E/NS1**

### **6.1.1. Genotipos y linajes del DENV-1**

La identificación del genotipo V en las cepas peruanas DENV-1 estudiadas de 2003 a 2012, de acuerdo a la clasificación de Goncalvez *et al.*, 2001, concordó con el estudio realizado en Brasil que reportó el mismo genotipo (Bona *et al.*, 2012). Por otro lado, estudios previos del DENV-1 en el país no llegan a nivel de genotipos y linajes, probablemente porque este serotipo no ha sido asociado a casos graves y fatales (Watts *et al.*, 1999; Montoya *et al.*, 2003).

El árbol filogenético del DENV-1 (Figura 19) agrupó las cepas en un clado con 3 linajes: I, II y III. El linaje I circuló de 2003 a 2007 en seis regiones del país, no se tiene evidencia de circulación durante los últimos 5 años del estudio; el linaje II circuló en la Costa Norte de 2007 a 2010 en tres regiones y el linaje III, de reciente circulación (2012) está asociado con cepas reportadas en Venezuela, Colombia y Ecuador, lugares de donde probablemente podrían haber ingresado al país.

Los resultados hallados para los tres linajes concuerdan con el estudio realizado en Colombia que describe la presencia de dos linajes (Méndez *et al.*, 2010), otro realizado en Brasil que describe tres linajes (dos Santos *et al.*, 2011) y con el estudio que describió un total de seis linajes para América Latina (Drumond *et al.*, 2012).

La circulación de diferentes linajes del DENV-1 en el país es una condición para posibles eventos de recombinación genética producto de la introducción, movimiento, evolución local y reemplazamiento de linajes, tal como se evidenció en Brasil y Argentina (Drumond *et al.*, 2012).

#### **6.1.2. Genotipos y linajes del DENV-2**

Se identificaron dos genotipos de DENV-2 en las cepas estudiadas: genotipo América y genotipo América/Asia. El árbol filogenético del DENV-2 agrupó el genotipo América en un clado con dos linajes: I y II, que circularon de 1998 a 2001; mientras que el genotipo América/Asia presentó 4 linajes: linaje I, que circuló el 2001 y linajes II, III y IV, que circularon de 2010 a 2012 (Figura 20).

En relación a los linajes I y II del genotipo América, concuerdan con los estudios realizados en Iquitos en 1995 en el cuál reportaron un brote por DENV-2 genotipo América, sin presencia de casos graves o fatales, a pesar del antecedente que hace cinco años antes la misma población estuvo expuesta a un brote asociado al DENV-1. En consecuencia era de esperarse que infecciones secundarias por un serotipo distinto debían producir por lo menos un 5% de casos graves, que finalmente no se presentó (Porter *et al.*, 1997; Watts *et al.*, 1999).

Por otro lado, la circulación en el 2001 del linaje I del genotipo América/Asia en Piura, se relacionó con un estudio realizado en la Costa Norte en 2000-2001, donde se determinó mediante RFLP, la circulación del genotipo Asia con presencia de los primeros casos de dengue hemorrágico y muertes (Montoya *et al.*, 2003). En este estudio, los resultados hallados mediante secuenciación y análisis filogenético, permiten afirmar que el genotipo que circuló en el Norte del país el 2001 fue América/Asia. Por lo cual en esta investigación demostramos la ventaja de usar secuenciación y análisis filogenético respecto a RFLP para tipificación de genotipos del DENV.

En cuanto al linaje II asignado inicialmente en una cepa de Loreto en 2010 y que posteriormente fue detectado en otras regiones del país en los años 2011 y

2012, correlaciona con el estudio realizado por Mamani *et al.*, 2011, quienes reportan la circulación del DENV-2 genotipo América/Asia en Iquitos, Loreto y lo asocian a virus aislados de Brasil de 2007 y 2008 que causaron casos graves y fatales. En el mismo brote de Iquitos, el grupo de Durand *et al.*, 2011, asoció la circulación del genotipo América/Asia con casos graves y muertes. Sin embargo, es necesario indicar que varios factores juegan un rol importante en el desarrollo de la patogenia del dengue, como infección secundaria, edad, inóculo viral, entre otros.

El linaje III circuló en Tumbes y Piura en 2011 y 2012, se asoció con virus aislados en Centro y Norte América en años anteriores; el linaje IV circuló en Tumbes en 2011. Probablemente, el ingreso fue de países limítrofes como Ecuador y Colombia mediante el transporte activo y pasivo.

La relación entre serotipo y genotipo del DENV-2 con la presentación clínica de la enfermedad es importante, pero no es el único factor, se debe evaluar otros factores como co-circulación de serotipos, presencia de casos de dengue durante todo el año, índices aédicos altos, entre otros, que condicionan la presencia de casos graves y la mayor cantidad de diferencias clínicas significativas respecto a los otros serotipos (manifestación hemorrágica más frecuentemente encontrada en la mayoría de epidemias), tal como lo mencionan Mostorino *et al.*, 2001, que señalaron que este serotipo es el responsable de mayor sintomatología y/o severidad de la enfermedad en el Perú independientemente de la condición de infección primaria y secundaria.

### **6.1.3. Genotipos y linajes del DENV-3**

La identificación del genotipo III en todas las cepas peruanas DENV-3 estudiadas de 1999 a 2012, según la clasificación de Chungue *et al.*, 1993 y Lanciotti *et al.*, 1994 confirman que es el único genotipo que ha circulado en nuestro país.

El árbol filogenético del DENV-3 (Figura 21) agrupó las cepas en un solo clado y comprende cinco linajes: I, II, III, IV y V. Los patrones de distribución

según año y área geográfica evidenció una co-circulación de hasta dos linajes en algunas regiones como Tumbes durante el 2004 (I, IV), Ucayali durante el 2004 (II, IV) y Lambayeque durante el 2005 (I, IV). Resultados similares fueron reportados en Medellín, Colombia, donde se estableció la co-circulación de dos linajes del genotipo III de 2002 a 2007 (Ospina *et al.*, 2010).

Los reportes en Perú asocian a DENV-3 con diversos brotes epidémicos como el ocurrido en la Costa Norte en 2001, con casos graves y fatales (Mostorino *et al.*, 2001; Montoya *et al.*, 2003), con el brote en Ucayali en 2000-2001 (Cobos *et al.*, 2001) y con el primer brote en Lima, en Comas, 2005 (Mamani *et al.*, 2005). Nuestros resultados confirman los reportes de la circulación de este serotipo en el país (INS-DGE, 2001), en nuestro caso, se reporta desde 1999.

Otro aspecto importante a resaltar es el hallazgo de un linaje V que corresponde a la región Junín de los años 2005 y 2007, es necesario complementar el estudio con cepas actuales a fin de establecer su circulación.

Los datos obtenidos respecto a cinco linajes corrobora el estudio realizado con cepas de Bolivia, Ecuador, Venezuela y Perú considerando los genes de Cápside, Premembrana / Membrana y Envoltura (Kochel *et al.*, 2008), donde reportaron un solo linaje para las cepas de Perú.

Por otro lado es importante resaltar que los genotipos del DENV-3 que circularon en las Américas hasta 1989 tenían bajo potencial epidémico y fueron aislados de pacientes no graves. Entre 1980 a 1990, dos nuevos genotipos fueron introducidos en el Pacífico Sur y las Américas: el genotipo I es asociado con grandes epidemias en Tahiti y Fiji y el genotipo III fue introducido en Centro América en 1990 en Nicaragua (Balmaseda *et al.*, 1999; Usuku *et al.*, 2001).

#### 6.1.4. Genotipos y linajes del DENV-4

La identificación del genotipo II en las cepas peruanas DENV-4 estudiadas de 1998 a 2012, según la clasificación de Lanciotti *et al.*, 1997 y Klungthong *et al.*, 2004. El árbol filogenético del DENV-4 agrupó las cepas peruanas en un clado con dos linajes: I y II (Figura 22). Nuestros resultados concuerdan con el estudio realizado por Forshey *et al.*, (2009) quienes reportan el mismo genotipo en Perú y Ecuador.

El linaje I agrupó la cepa de Ucayali de 1998 y cepa de La Libertad de 2012, con cepas de Venezuela de 2007-2008 y Brasil de 2010, lo que sugiere la posibilidad de procedencia de dichos países, como se observa en un estudio sobre circulación del genotipo I en el continente reportado en el Norte de Brasil en 2010 (Temperao *et al.*, 2011), el cual pudo haber ingresado directamente de China debido al intenso comercio que se tiene con dicho país (de Melo, *et al.*, 2009).

El linaje II, que agrupó cepas de la Costa Norte, Loreto y una cepa de Colombia entre 2007 a 2012, nos permite plantear un posible ingreso a Perú por los países de la frontera Norte (Brasil y Ecuador) tal como lo plantearon Forshey *et al.*, 2009, al mencionar que el re-ingreso del DENV-4 pudo ser a través de la Costa Norte de Perú para luego dispersarse a Iquitos y otras localidades de la Amazonia peruana. Por otro lado, se debe remarcar que la introducción del DENV-4 en el continente americano se dio en Puerto Rico en 1981, de allí se ha presentado en el Caribe (Pinheiro *et al.*, 1997) y la dispersión se fue dando durante los últimos 25 años a los países de Sudamérica (Nogueira *et al.*, 2007) asociado al genotipo II y reportado por Brasil en el 2006 (de Melo, *et al.*, 2009).

Los reportes de casos por DENV-4 en Perú se dieron a partir del 2001, cuando se presentó el primer brote de dengue con casos graves en el país y no hubo asociación con gravedad de la enfermedad (Mostorino *et al.*, 2001; Montoya *et al.*, 2003), por otro lado un estudio en Tailandia, reconoció que el DENV-4 es el menos prevalente (2%), pero fue asociado al 10% de los casos hemorrágicos

en niños que cursan infecciones secundarias (Nisalak *et al.*, 2003).

Debemos indicar que este serotipo es el de menos muestras en el estudio, probablemente por la baja prevalencia respecto a los otros serotipos (INS-DGE, 2011), aunque pese a esa particularidad, llegó a desplazar completamente al DENV-3 en la ciudad de Iquitos en 2008 (Forshey *et al.*, 2009).

## **6.2. Análisis filogenético del genoma completo de la cepa 121776510, DENV-2, genotipo América/Asia**

La secuenciación del genoma completo del DENV-2 cepa 1217776510 procedente de Iquitos del año 2010 agrupó dentro del genotipo América Asia, linaje II, corroborando los resultados obtenidos mediante secuenciación del fragmento E/NS1 de 220bp. Es importante resaltar que la longitud del genoma obtenido de 10 518 nucleótidos presentó un 99% de similaridad con DENV-2 reportado en Sao Paulo, Brasil (BID-V3637) y que estuvo asociado a casos de dengue grave y muerte en Brasil (Michelli *et al.*, 2010) y en la región Norte del país (Mamani *et al.*, 2011)

## **6.3. Análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los fragmentos E/NS1**

Se sabe que la mayoría de los sitios nucleotídicos en el genoma del dengue están evolucionando bajo presión selectiva debido a la asociación de la replicación del virus tanto en células humanas y células de mosquitos (Vasilakis *et al.*, 2011). La presión selectiva dentro de los vectores también podría dar lugar a la diversidad genética y los cambios en el panorama epidemiológico, como es el caso en Tailandia, donde la alternancia de clados de DENV-1 ha incrementado la transmisión del DENV mediante los vectores (Lambrechts *et al.*, 2011). Este mismo fenómeno podría estar dándose en nuestro país donde el DENV-1 es el serotipo más prevalente en todas las áreas geográficas desde su reingreso en 1990 a la fecha (INS-DGE, 2011).

El número de 33 cambios nucleotídicos para DENV-2 es mayor a los encontrados para los otros serotipos (DENV-1, 9; DENV-3, 19; DENV-4, 5)

debido a la este serotipo es el único que presentó dos genotipos. De la misma forma para los cambios aminoacídicos, DENV-2 reportó el mayor número de cambios

#### **6.4. Distribución de los genotipos y linajes de los virus dengue según la región geográfica y año de aislamiento**

El impacto de los cambios virales se traduce en un incremento en la virulencia de la enfermedad cambiando la epidemiología de la enfermedad en todo el mundo. Los tres principales factores que contribuyen en la diversidad genética del virus dengue son: evolución natural, mutación (ya sea por resistencia al tratamiento o por el estado de inmunidad del paciente) y recombinación (Mannapperuma *et al.*, 2012).

Los resultados del estudio corroboran los reportes previos que han identificado genotipos dentro de cada serotipo del virus dengue. El rápido proceso evolutivo incrementa la ocurrencia de la diversidad de genotipos y linajes debidos principalmente a que los virus RNA de cadena positiva evolucionan rápidamente (Perez *et al.*, 2009) por carecer de actividad de autocorrección, resultando en una tasa de error durante la replicación viral que se estima entre  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  mutaciones por nucleótido por ciclo de replicación (Mas *et al.*, 2010).

La clasificación de los genotipos a menudo puede revelar el origen geográfico de las cepas del DENV, excepto los genotipos selváticos, lo que da lugar al seguimiento de la ruta de transmisión de virus a través del distancia, lugar y tiempo y sirve de base para los estudios de epidemiología molecular que puede determinar si las epidemias de dengue son causados por la introducción de nuevos genotipos del virus dengue o por la re-emergencia de cepas endémicas.

En los últimos 20 años el acceso a las tecnologías de Biología molecular ha permitido secuenciar diferentes genes del virus dengue y actualmente la aplicación de las mismas a menores costos contribuye en una larga colección

de virus para ser estudiarlos. La aplicación de técnicas como el RT-PCR facilita la identificación de los serotipos virales.



## VII CONCLUSIONES

1. El serotipo DENV-1, correspondió al genotipo V y presentó tres linajes: el linaje I que circuló de 2003 a 2010, el linaje II se presentó entre 2007 a 2010 y el linaje III se reportó en 2012.
2. Se identificó el serotipo DENV-2, con dos genotipos: El genotipo América con dos linajes entre 1998 a 2001. El genotipo América/Asia, linaje I correspondió a 2001, los linajes II, III y IV se reportaron entre 2010 a 2012.
3. El serotipo DENV-3, presentó el genotipo III con cinco linajes: el linaje I circuló de 1999 a 2001, el linaje II fue reportado entre 2004 a 2007, el linaje III circuló de 1999 a 2010, el linaje IV fue reportado para los años 2004 a 2012 y el linaje V circuló de 2005 a 2007.
4. Se identificó el serotipo DENV-4, genotipo II con dos linajes: el linaje I circuló 1998 y 2012, el linaje II fue reportado el 2007 y el 2012.
5. No existe relación directa entre los genotipos y linajes de los cuatro serotipos de los virus dengue respecto al área geográfica y el año de aislamiento.
6. La dispersión de los genotipos y linajes por cada serotipo se presentó en diversas áreas geográficas de Perú de 1998 a 2012, siendo el DENV-3 el más divergente con cinco linajes y el DENV-4 menos divergente con dos linajes.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudios retrospectivos y prospectivos que permitan conocer las características genéticas del genoma completo de los cuatro serotipos del virus en diferentes años con el objetivo de definir la progresión de la evolución viral.
2. Realizar los aislamientos virales en mosquitos con diferentes cepas del virus dengue para comprender la capacidad replicativa de cada variante genética y establecer la relación con la magnitud y severidad de la enfermedad.
3. Contar con un banco de secuencias en la web que permita relacionar la información clínica epidemiológica de forma que se pueda monitorear en forma permanente la emergencia y re-emergencia de los serotipos del virus dengue.
4. Establecer la relación genética del virus dengue y la respuesta del sistema inmunológico en los pacientes que cursan cuadros graves de la enfermedad.
5. Plantear estudios para evaluar posibles recombinaciones de linajes de los virus dengue que circulan en el país.
6. Implementar la caracterización genética oportuna de estos aislamientos virales y su distribución geográfica de forma que ayude a tomar las medidas preventivas para evitar las formas graves y/o fatales de la enfermedad.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson JR; Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75(5):886–892.

Applied Biosystems. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol.

Armstrong PM; Rico-Hesse R. Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2001; 1(2):159– 168.

Balmaseda A; Sandoval E; Pérez L; Gutiérrez CM; Harris E. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. 1999; *Am J Trop Med Hyg.* 61(6):893–897.

Bandyopadhyay S; Lum LC; Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical Medicine and International Health.* 2006; 11(8):1238-1255.

Barth; OM. Atlas of dengue viruses morphology and morphogenesis. - Rio de Janeiro: 2000.

Bessaud M; Peyrefitte CN; Pastorino BAM; Tock F; Merle O; Colpart J; Dehecq J; Girod R; Jaffar-Bandjee M; Glass PJ; Parker M; Tolou H; Grandadam M. Chikungunya virus strains; Reunion Island outbreak. *Emer Infec Dis.* 2006; 12(10):1604–1606.

BioEdit © 1997-2011 [sede Web]. California: Tom Hall; [actualizada 11 de abril 2011; acceso 21 de agosto 2012]. Disponible en: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

Bona AC; Twerdochlib AL; Navarro-Silva MA. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná; Brazil; based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; Jun 45(3):297-300.

Bonilauri P; Bellini R; Calzolari M; Angelini R; Venturi L; Fallacara F; Cardioli P; Angelini P; Venturelli C; Meriardi G; Dottori M. Chikungunya virus in *Aedes albopictus*; Italy. Emer Infec Dis. 2008; 14(5):852– 854.

Cáceres O; Mamani E. Análisis filogenético del virus dengue 3 aislado en casos de dengue clásico en Comas. Lima; Perú 2005. Bol Inst Nac Salud. 2005; 11(5-6): 121-22.

Cauchi MR; Henchal EA; Wright PJ. The sensitivity of cell-associated dengue virus proteins to trypsin and the detection of trypsin-resistant fragments of the nonstructural glycoprotein NS1. Virology. 1991; 180: 659-667.

Christenbury JG; Aw PP; Ong SH; Schreiber MJ; Chow A; Gubler DJ; Vasudevan SG; Ooi EE; Hibberd ML. A method for full genome sequencing of all four serotypes of the dengue virus. J Virol Methods. 2010;169: 202–206

Chungue E; Deubel V; Cassar O; Laille M and Martin PMV. Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. J Gen Virol. 1993; 74:2765-2770.

Cleland JB; Bradley B. On the transmission of Australian dengue by the mosquito *Stegomyia fasciata*. Med J Aust. W. 1916; 2:179-205.

Clyde K; Kyle JL; Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. J Virol. 2006; 80: 11418-11431.

Cobos M; Gutiérrez V; García M; Mamani E; Fernández R; Rimarachín R; Paredes T; Pérez T. Estudio Serológico y Viroológico del Brote de Dengue en la provincia de Coronel Portillo Ucayali; Perú; Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública. 2004; 21 (3).

Cologna R; Armstrong PM; Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. J Virol. 2005; 79(2):853–859.

Cruz ACR; Galler R; Silva EVP; Silva MO; Carneiro AR; Rosa EST. Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 isolated in Brazil from 1991 to 2008. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2010; 1:25-34.

de Melo FL; Romano CM; de Andrade ZP: Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(4):e390.

Deen J et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*. 2006; 368:170-173.

DNASTAR Inc. [sede Web]. Wisconsin: DNASTAR; Inc.; [acceso 21 de agosto 2012]. SeqMan NGen. Disponible en: <http://www.dnastar.com/t-sub-products-genomics-seqman-ngen.aspx>

Domingo C; Niedrig M; Gascón J; Palacios G; Reyes N; Malo MJ; Wichmann O; Ruiz J; Schultze D; Schunk M; Puente S; Vinner L; Van Esbroeck M; Schuffenecker I; Grandadam M; López-Vélez R; Tenorio A. Molecular surveillance of circulating dengue genotypes through European travelers. *J. Travel Med*. 2011; 18(3); 183–190.

Domingo C; Palacios G; Niedrig M; Cabrerizo M; Jabado O; Reyes N; Lipkin WI; Tenorio A. A New Tool for the Diagnosis and Molecular Surveillance of Dengue Infections in Clinical Samples. *Dengue Bulletin*. 2004; Vol 28.

dos Santos FB; Nogueira FB; Castro MG; Castro MG; Nunes PC; de Filippis AM; Faria NR; Simões JB; Sampaio SA; Santos CR; Nogueira RM. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro; Brazil. *Virol J*. 2011; doi:[10.1186/1743-422X-8-387](https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-387)

Drumond BP; Mondini A; Schmitdt D; Bosch I; Nogueira M. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Arch Virol*. 2012; doi 10.1007/s00705-012-1393-9

Durand S; Fiestas V; Sihuincha M; Chávez C; Vásquez V; Torrejón C; Rodríguez H; Cabezas C. Impacto de la epidemia de dengue con un nuevo

linaje del DENV-2 genotipo americano / asiático en la demanda de servicios del Hospital de apoyo de Iquitos “César Garayar García” Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2011; 28(1): 156-66.

Falgout; B; Markoff; L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. J Virol. 1995; 69: 7232-7243.

Forshey BM; Morrison AC; Cruz C; Rocha C; Vilcarromero S; Guevara C; Camacho DE; Alava A; Madrid C; Beingolea L; Suarez V; Comach G; Kochel TJ. Dengue virus serotype 4; northeastern Peru; 2008. Emerg Infect Dis [serial on the Internet]. 2009 November [date cited]. Disponible en: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/11/09-0663.htm>

Foster JE; Bennett SN; Vaughan H; Vorndam V; McMillan WO; Carrington CV. Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the Caribbean. Virology. 2003; 306(1):126–34.

Freier JE; Rosen L. Vertical transmission of dengue viruses by mosquitoes of the *Aedes scutellaris* group. Am J Trop Med Hyg. 1987; 37(3): 640–647.

Goncalvez AP; Escalante AA; Pujol FH; Ludert JE; Tovar D; Salas RA; Liprandi F. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. Virology. 2001; 303:110–119.

Gratz NG. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol. 2004; 18(3):215–227.

Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler D; Kuno G; editors. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: CAB International. 1997; p. 1-22.

Gubler DJ and Meltzer M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. Adv Virus Res. 1999; 53: 35-70.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11(3):480-96.

Gubler DJ; Clark GG. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: the emergence of a global health problem. *Emer Infec Dis.* 1995; 1(2):55–57.

Guha-Sapir D; Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerging Themes in Epidemiology*; 2005 (Open access journal; <http://www.ete-online.com/content/2/1/1>).

Guzman MG; Deubel V; Pelegrino JL; Rosario D; Marrero M; Sariol C; Kouri G. Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 52(3):241–246.

Halsey E; Marks M; Gotuzzo E; Fiestas V; Suarez V; Vargas J; Aguayo N; Madrid C; Vimos C; Kochel T; Laguna-Torres A. Correlation of Serotype-Specific Dengue Virus Infection with Clinical Manifestations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 May; 6(5): 1638.

Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica.* 2006; 20: 407-415.

Hammon WM; Rudnick A; Sather G; Rogers KD; Morse LJ. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. *Trans Assoc Am Physicians.* 1960; 73:140–155.

Harris E; Roberts TG; Smith L; Selle J; Kramer LD; Valle S; et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(9):2634-39.

Holmes EC; Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol.* 2000; 8(2):74–77.

INS-DGE. Reporte de la vigilancia de serotipos y genotipos de dengue en el Perú; 2011

Johansson MA; Dominici F; Glass GE. Local and global effects of climate on dengue transmission in Puerto Rico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(2):e382.

Kawada H; Higa Y; Nguyen YT; Tran SH; Nguyen HT; Takagi M. Nationwide investigation of the pyrethroid susceptibility of mosquito larvae collected from used tires in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(3):e391.

Klungthong C; Zhang C; Mammen MP Jr; Ubol S; Holmes EC. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok; Thailand. *Virology*. 2004; 329:168–179.

Kochel T; Aguilar P; Felices V; Comach G; Cruz C; Alava A; Vargas J; Olson J; Blair P. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Northern South America: 2000-2005. *Infect Genet Evol*. 2008; 8(5):682-8.

Kuno G. Research on dengue and dengue-like illness in East Asia and the Western Pacific during the first half of the 20th century. *Rev Med Virol*. 2007; 17:327–341.

Kuno G. Review of the factors modulating dengue transmission. *Epidemiol Rev*. 1995; 17(2):321–335.

Lambrechts L; Fansiri T; Pongsiri A et al. Dengue-1 virus clade replacement in Thailand associated with enhanced mosquito transmission. *J Virol*. 2011; doi:[10.1128/JVI.06458-11](https://doi.org/10.1128/JVI.06458-11)

Lanciotti R; Calisher CH; Gubler DJ; ChangGJ; Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(3): 545-51.

Lanciotti RS; Gubler DJ; Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*. 1997; 78:2279–2286.



Lanciotti RS; Lewis JG; Gubler DJ; Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol.* 1994; 75:65–75.

Larkin MA; Blackshields G; Brown NP; Chenna R; McGettigan PA; McWilliam H; Valentin F; Wallace IM; Wilm A; Lopez R; Thompson JD; Gibson TJ; Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics.* 2007; 23:2947-2948.

Lewis JA; Chang GJ; Lanciotti R; Kinney RM; Mayer LW; Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology.* 1993; 197:216–224.

Lindenbach BD and Rice CM. *Flaviviridae: the viruses and their replication.* En: Knipe DM; Howley PM. (Eds.); *Fundamental Virology.* Lippincott Williams and Wilkins; Philadelphia. 2001; pp 589-639.

Macherey - Nagel. NucleoSEQ. Clean-up of Sequencing Reactions. User Manual. December 2010 / Rev. 03

Mackerras IM. Transmission of dengue fever by *Aedes (Stegomyia) scutellaris* Walk. in New Guinea. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1946; 40:295–312.

Mamani E; Álvarez C; García P; Figueroa D; Gatti M; Guio H; Merino S; Valencia P; Calampa C; Franco L; Cabezas C. Circulación de un linaje diferente del virus dengue 2 genotipo América / Asia en la región Amazónica de Perú; 2010. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2011; 28(1): 72-7

Mamani E; Cáceres O; García M; Gutiérrez V; Cabezas C; Harris E. Tipificación molecular del virus dengue 3 durante el brote epidémico de dengue clásico en Lima; Perú 2005. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2005; 22(3): 161-64.

Mannapperuma MMATN; Wijesinghe MWACR; Weerasinghe AR. Learning the Diversity and Evolutionary Pattern of the Dengue Virus. *IPCBEE.* 2012; vol.31.

Mas A; Lopez-Galindez C; Cacho I; Gomez J; Martinez MA. Unfinished stories on viral quasispecies and Darwinian views of evolution. *J Mol Biol;* 2010; 397: 865–877.

Mendez JA; Usme-Ciro JA; Domingo C; Rey GJ; Sanchez JA; Tenorio A; Gallego-Gomez JC: Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virology*. 2010; 7:226.

Messer WB; Gubler DJ; Harris E; Sivananthan K; de Silva A. Emergence and global spread of a dengue serotype 3; subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9; 800–809.

Michelli MF; Galvão JM, Ferreira OC; Ferreira DF, Lima DB, Santos FB. Two Lineages of Dengue Virus Type 2, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(3):576-578.

Miller JL; de Wet BJ; Martinez-Pomares L; Radcliffe CM; Dwek RA; Rudd PM; Gordon S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog.* 2008; 4: e17.

Miller S; Sparacio S; Bartenschlager R. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem.* 2006; 281: 8854-8863.

Montoya Y; Holechek S; Caceres O; Palacios A; Burans J; Guevara C; Quintana F; Herrera V; Pozoy E; Anaya E; Mamani E; Gutierrez V; Ladron de Guevara A; Fernandez E; Asmat P; Alva-Davalos V; Hoguin C; Laguna A; Morales A; Minaya P; Kochel T. Circulation of Dengue Viruses in North-Western Peru; 2000-2001. *Dengue Bulletin* 2003; 27:52-62.

Mostorino R; Rosas A; Gutiérrez V; Anaya E; Cobos M; García M. Manifestaciones clínicas y distribución geográfica de los serotipos de dengue en el Perú, año 2001. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2002; 19(4): 171-80.

Mukhopadhyay S; Kuhn RJ; Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3: 13-22.

Nisalak A; Endy TP; Nimmannitya S; Kalayanaroj S; Thisyakorn U; et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999 *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68(2):191-202.

Nogueira RM; de Araujo JM; Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil; 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007; 22:358-63. DOI: 10.1590/S1020-49892007001000009

Nuegoonpipat A; Berlioz-Arthaud A; Chow V; Endy T; Lowry K; Mai le Q; Ninh TU; Pyke A; Reid M; Reynes JM; Su Yun ST; Thu HM; Wong SS; Holmes EC; Aaskov J. Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains. *Virology*. 2004; 329:505–512.

OMS, 2012 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>. 2012

Ospina M; Díaz F; Osorio J. Prolonged Co-circulation of Two Distinct Dengue Virus Type 3 Lineages in the Hyperendemic Area of Medellín; Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83(3): 672–678.

Perera R; Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Annu Rev Microbiol*. 2008; 11:369–377.

Perez G; Diaz A; Camacho M; Cisneros A; Muñoz M. Multiple recombinants in two dengue virus; serotype-2 isolates from patients from Oaxaca; Mexico. *BMC Microbiology*. 2009; vol. 9; no. 260; pp. 260.

Phillips I; Need J; Escamilla J; Colán E; Sanchez S. Primer brote de dengue documentado en la región amazónica del Perú. *Bol Of Sanit Panam*. 1993; (6)114.

Phillips I; Need J; Escamilla J; Colan E; Sanchez S; Rodríguez M; et al. First documented outbreak of dengue in the Peruvian Amazon Region. *Bull Pan Am Health Organ*. 1992; 26(3): 201-7.

Pinheiro F and Nelson M. Re-emergence of dengue and emergence of dengue haemorrhagic fever in the Americas. *Dengue Bulletin*. 1997;21:1-6.

Porter KR; Swing D; Puri B; Hayes CG; Halstead SB; Watts DM. Genotype analysis of dengue 2 viral isolates from patients in the Amazon river basin of Peru. Program and abstract of the 46 th Annual Tropical Medicine and Hygiene.

1997.

Qiagen. QIAamp Viral RNA Mini Handbook 04 / 2010.

Qiagen. QIAquick Gel Extraction Kit - Handbooks & Protocols. 2007.

Reiter P. Climate change and mosquito-borne disease: knowing the horse before hitching the cart. *Rev Sci Tech*. 2008; 27(2):383–398.

Rico-Hesse R; Harrison LM; Salas RA; Tovar D; Nisalak A; Ramos C; Boshell J; de Mesa MTR; Nogueira RMR; da Rosa AT. Origins of dengue type-2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997; 30:244–251.

Rico-Hesse. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res*. 2003; 59:315–341.

Rico-Hesse. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990; 174:479–493.

Rigau-Perez J. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infectious Diseases*. 2006; 6:297–302.

Rosen L; Rozeboom LE; Sweet BH; Sabin AB. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. *Am J Trop Med Hyg*. 1954; 3(5):878–882

Rudnick A. The ecology of the dengue virus complex in peninsular Malaysia; p.7. In T. Pang and R. Pathmanathan (ed.); *Proceedings of the International Conference on Dengue/DHF*. University of Malaysia Press; Kuala Lumpur; Malaysia. 1984.

Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*. 1952 Jan;1(1):30-50.

Sabin AB. The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriol Rev*. 1950 Sep;14(3):225-32.

Schneider J and Droll D. A time line for dengue in the Americas to december 31; 2000 and noted first occurrences [documento en internet]. Washington DC: Pan American Health Organization; 2001. [Fecha de acceso: junio del 2005]. Disponible en: [www.paho.org/ English/HCP/HCT/VBD/dengue\\_finaltime.doc](http://www.paho.org/English/HCP/HCT/VBD/dengue_finaltime.doc).

Shepard DS; Coudeville L; Halasa YA; Zambrano B; Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(2):200-7.

Smith CEG. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *J Trop Med Hyg.* 1956; 59(10):243–251.

Swee HO. Molecular epidemiology of dengue viruses from complete genome sequences. Original document stored on the publication server of the University of Basel [edoc.unibas.ch](http://edoc.unibas.ch). 2010

Tamura K; Peterson D; Peterson N; Stecher G; Nei M; Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood; Evolutionary Distance; and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*; 2011.

Temporao JG; Penna GO; Carmo EH; Coelho GE; Do SSAR; Teixeira NM; Da CVP: Dengue virus serotype 4; Roraima State; Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(5):938-940.

Thu HM; Lowry K; Myint TT; Shwe TN; Han AM; Khin KK; Thant KZ; Thein S; Aaskov J. Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2; 3; and 4 by dengue 1 . *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 593 – 597.

Twiddy SS; Farrar JJ; Nguyen VC; Wills B; Gould; EA; Gritsun T; Lloyd G; Holmes EC. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology.* 2002; 298:63–72.

Usuku S; Castillo L; Sugimoto C; Noguchi Y; Yogo Y; Kobayashi N. Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. *Arch Virol.* 2001; 146:1381–1390.

Vasilakis N; Cardoso J; Hanley KA et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. Nat Rev Microbiol. 2011; doi: [10.1038/nrmicro2595](https://doi.org/10.1038/nrmicro2595)

Vaughn DW. Dengue lessons from Cuba. Am J Epidemiol. 2000; 125(9):800–803.

Wang E; Ni H; Xu R; Barrett AD; Watowich SJ; Gubler DJ; Weaver SC. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. J Virol. 2000; 74(7):3227–3234.

Watts D; Ramirez G; Cabezas C; Wooster MT. Arthro-pod-Borne Diseases in Peru. Book chapter in An Overview of Arthropod-Borne Diseases in Peru. Evando Chagas Institute; 1998.

Watts DM; Porter KR; Putvatana P; Vasquez B; Calampa C; Hayes CG; et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. Lancet 1999; 354 (9188): 1401-2.

Welsch S; Miller S; Romero-Brey I; Merz A; Bleck CKE; Walther P; Fuller SD; Antony C; Krijnse-Locker J; Bartenschlager R. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. Cell Host Microb. 2009; 5: 365-375

Whitehead SS; Blaney JE; Durbin AP; Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. Nat Rev Microbiol. 2007; 5:518–528.

WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Factsheet No 117; revised May 2008. Geneva; World Health Organization; 2008. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

WHO. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever prevention and control. World Health Assembly Resolution WHA55.17; adopted by the 55th World Health Assembly. 2002. Disponible en [http://www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA55/ewha5517.pdf](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA55/ewha5517.pdf)

WHO. Dengue Guidelines for Diagnosis; Treatment and Control. Geneva: WHO. 2009. Disponible en:

[http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf)

WHO. Revision of the International Health Regulations. World Health Assembly Resolution WHA58.3; adopted by the 58th World Health Assembly; 2005.

Disponible en: [http:// www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA58/WHA58\\_3-en.pdf](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA58/WHA58_3-en.pdf)

Wilder-Smith A; Gubler DJ. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin North Am.* 2008; 92:1377–1390.

Zhang W; Chipman PR; Corver J; Johnson PR; Zhang Y; Mukhopadhyay S; Baker TS; Strauss JH; Rossmann MG; Kuhn RJ. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol.* 2003; 10: 907- 912.

## X. ANEXOS

**Tabla 6.** Relación de materiales de laboratorio empleado en el estudio.

RELACION DE MATERIALES UTILIZADOS
• Kit de secuenciación Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems)
Kit de extracción de ARN viral. Qiamp viral mini kit (Qiagen).
• Kit de purificación. Qiaquick gel extraction kit (Qiagen)
• NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel)
• Micropipetas graduadas de 0.5-10, 2- 20, 10-100, 20-200, 100-1000 uL.
• Puntas desechables con filtro capacidad de 10, 20, 100, 200, 1000 uL.
• Agua Ultrapura libre de ARNasas y ADNasas (Gibco-Invitrogen)
• Buffer 10x GeneAmp (Applied Biosystems)
• MgCl 25 mM GeneAmp (Applied Biosystems)
• dNTP 10 mM GeneAmp (Applied Biosystems)
• Enzima Taq Polimerasa Platinum® (Invitrogen)
• Transcriptasa reversa MMLV SuperScript® II (Invitrogen)
• Crioviales de 0.2 mL, y tubos centrifuga de 1.5mL.
• Parafina plástica (Parafilm "M")
• Primers (20pmol) S1871DEN1 5'-TGGCTGAGACCCARCATGGNAC-3'
• Primers (20pmol) S1871DEN2 5'-TAGCAGAAACACARCATGGNAC-3'
• Primers (20pmol) S1871DEN3 5'-TCTCCGAAACGRCARCATGGNAC-3'
• Primers (20pmol) S1871DEN4 5'-TGGCAGAAACACARCAYGGNAC-3'
• Primers (20pmol) AS2622DEN1 5'-CAATTCATTTGATATTTGYTTCCAC-3'
• Primers (20pmol) AS2622DEN2 5'-CAATTCTGGTGTATTTGYTTCCAC-3'
• Primers (20pmol) AS2622DEN3 5'-CAGTTCATTRGCTATTTGYTTCCAC-3'
• Primers (20pmol) AS2622DEN4 5'-TAGCTCGTTGGTATTTGYTTCCAC-3'
• Primers (20pmol) S2176DEN1 5'-ATCCTGGGAGACACYGCNTGGG-3'
• Primers (20pmol) S2176DEN2 5'-ATTTTRGGTGACACAGCNTGGG-3'
• Primers (20pmol) S2176DEN3 5'-ATCTTGGGAGACACAGCNTGGG-3'
• Primers (20pmol) S2176DEN4 5'-ATTCTAGGTGAAACAGCNTGGG-3'
• Primers (20pmol) AS2504DEN 5'-TGRAAYTTRTAYTGYTCTGTCC-3'
• TAE 1x
• Agarosa (Promega)
• Cámaras para electroforesis horizontal de 8, 15 y 40 pozos (BioRad)
• Soportes y moldeadores de agarosa (BioRad)
• Peines para 8, 15, 20, 22, 40 pocillos (BioRad)
• Buffer de cargado (Loading Dye Buffer 6X – Fermentas)
• Marcador de peso molecular de100 pb. (Fermentas)
• Solución decontaminadora de DNAs/RNAs ( Invitrogen)



**Tabla 7.** Relación de equipos de laboratorio empleado en el estudio.

RELACION DE EQUIPOS UTILIZADOS
• Termociclador PTC 200 (MJ Research)
• Centrifuga 5417C (Eppendorf)
• Qiagylity (Qiagen)
• Trasluminador UV TM-20 (UVP)
• Fotodocumentador de geles (Biorad)
• Cabina de Seguridad Biológica Clase II A2 (Labconco)
• Secuenciador ABI Prism 310 (Applied Biosystems)
• Balanza de precisión Adventur Pro AS64 (Ohaus)
• Congeladoras -20 °C, -40°C, -70 °C (Thermo)
• Centrífuga al vacío SC 110 (Savant)
• Placa de calentamiento Thermo Mixer R (Eppendorf)
• Cabina Pre – PCR para el area limpia (labconco)

**Tabla 8.** Relación de las 20 cepas de DENV-1 incluidas en el estudio según área geográfica y año de aislamiento en Perú.

ÁREA GEOGRÁFICA	AÑO	CÓDIGO
Cajamarca	2003	23591
La Libertad	2004	14839
Lambayeque	2004	2156
Lambayeque	2004	15250
Cajamarca	2007	28873
La Libertad	2007	2195
Lambayeque	2007	3924
Lambayeque	2007	3945
Lima	2007	8316
Piura	2007	DE39
Piura	2007	DE35
Piura	2007	DE34
San Martín	2007	4435
San Martín	2007	4439
San Martín	2007	4445
Ucayali	2007	287
Tumbes	2009	51368409
Piura	2010	11445610
Lima, Comas	2012	51698112
Madre de Dios	2012	60567612

**Tabla 9.** Relación de las cepas 27 de DENV-2 incluidas en el estudio según área geográfica y año de aislamiento en Perú

ÁREA GEOGRÁFICA	AÑO	CÓDIGO
Piura	1998	7099
Ucayali	1998	1158
Piura	1998	14675
San Martin	1999	13015
Piura	2001	10442
Lambayeque	2001	21095
Lambayeque	2001	21115
San Martin	2001	13664
Loreto	2010	1107688
Loreto	2010	121776410
Loreto	2010	121776510
Loreto	2010	121906810
Lima	2011	010724011
La Libertad	2011	010787111
San Martin	2011	010236711
Loreto	2011	011236611
Madre de Dios	2011	091794411
Huánuco	2011	092439011
Cajamarca	2011	092439211
Tumbes	2011	120167011
Tumbes	2011	120169111
Loreto	2012	020653012
Amazonas	2012	060280212
Amazonas	2012	060280612
Piura	2012	052721712
Piura	2012	060414312
Cajamarca	2012	020237012

**Tabla 10.** Relación de las 52 cepas de DENV-3 incluidas en el estudio según área geográfica y año de aislamiento en Perú

ÁREA GEOGRÁFICA	AÑO	CÓDIGO	ÁREA GEOGRÁFICA	AÑO	CÓDIGO
Huánuco	1999	18066	Lima	2005	19535
San Martín	1999	15076	Loreto	2005	17374
Ancash	2003	20085	Loreto	2005	Yur698
Huánuco	2003	20722	Loreto	2005	Yur707
Lambayeque	2003	28108	Huánuco	2006	67498
Lambayeque	2003	33119	Amazonas	2007	3013
Piura	2003	23575	Amazonas	2007	3017
Piura	2003	24539	Huánuco	2007	44
Piura	2003	32936	Huánuco	2007	47
Cajamarca	2004	31337	Junín	2007	1785
Lambayeque	2004	18507	Lima	2007	4245
Loreto	2004	27402	Loreto	2007	1675
Piura	2004	19147	Loreto	2007	4000
Tumbes	2004	27598	Piura	2007	72364
Tumbes	2004	27618	San Martín	2007	4431
Ucayali	2004	26595	San Martín	2007	4462
Ucayali	2004	30362	San Martín	2007	6984
Cajamarca	2005	11070	San Martín	2007	6984
Cajamarca	2005	54464	Ucayali	2007	5778
Junín	2005	6782	Ucayali	2007	5772
Junín	2005	26172	Ucayali	2007	275
Lambayeque	2005	19812	Ucayali	2007	280
Lambayeque	2005	15580	M. de Dios	2010	60207910
Lambayeque	2005	7784	La Libertad	2012	60813412
Lambayeque	2005	8137	Lima	2012	51355012
Lima	2005	19505	Piura	2012	60419912

**Tabla 11.** Relación de las 10 cepas de DENV-4 incluidas en el estudio según área geográfica y año de aislamiento en Perú.

ÁREA GEOGRÁFICA	AÑO	CÓDIGO
Ucayali	1998	225
La Libertad	2007	2185
La Libertad	2007	2210
La Libertad	2007	2213
Piura	2007	2181
Piura	2007	2207
Piura	2007	7992
Piura	2007	9038
La Libertad	2012	60576512
Tumbes	2012	60275612

**Tabla 12.** Primers utilizados para realizar la RT-PCR y Nested PCR para amplificar y secuenciar la región E/NS1 de los cuatro serotipos del virus dengue.

PRIMERS*	SECUENCIA ¶	POSICIÓN (GENOMA)	PCR
<b>S1871DEN1</b>	5'-TGGCTGAGACCCARCATGGNAC-3'	1869 to 1890	RT-PCR
<b>S1871DEN2</b>	5'-TAGCAGAAACACARCATGGNAC-3'	1871 to 1889	
<b>S1871DEN3</b>	5'-TCTCCGAAACGCARCATGGNAC-3'	1863 to 1884	
<b>S1871DEN4</b>	5'-TGGCAGAAACACARCAYGGNAC-3'	1873 to 1894	
<b>AS2622DEN1</b>	5'-CAATTCATTTGATATTTGYTTCCAC-3'	2620 to 2644	RT-PCR
<b>AS2622DEN2</b>	5'-CAATTCTGGTGTTATTTGYTTCCAC-3'	2622 to 2646	
<b>AS2622DEN3</b>	5'-CAGTTCATTRGCTATTTGYTTCCAC-3'	2614 to 2638	
<b>AS2622DEN4</b>	5'-TAGCTCGTTGGTTATTTGYTTCCAC-3'	2624 to 2648	
<b>S2176DEN1</b>	5'-ATCCTGGGAGACACYGCNTGGG-3'	2174 to 2195	Nested PCR
<b>S2176DEN2</b>	5'-ATTTTRGGTGACACAGCNTGGG-3'	2176 to 2197	
<b>S2176DEN3</b>	5'-ATCTTGGGAGACACAGCNTGGG-3'	2168 to 2189	
<b>S2176DEN4</b>	5'-ATTCTAGGTGAAACAGCNTGGG-3'	2178 to 2199	
<b>AS2504DEN</b>	5'-TGRAAYTTRTAYTGYTCTGTCC-3'	2506 - 2527 DEN-1	Nested PCR
		2504 - 2525 DEN-2	
		2496 - 2517 DEN-3	
		2506 - 2527 DEN-4	

\*La primera letra S indica Sentido y AS indica antisentido

¶ Degeneraciones: N: A/C/g/T; R:A/g; Y:T/C

**Tabla 13.** Preparación de la mezcla maestra para la reacción de secuenciación con el kit BigDye terminator v. 3.1.

COMPONENTE	SENTIDO	ANTISENTIDO
RR 100 BigDye	4.00	4.00
Buffer 5X BygDye	2.00	2.00
Primer sentido	2.00	0.00
Primer antisentido	0.00	2.00
H <sub>2</sub> O	5.00	5.00
ADN purificado	2.00	2.00

**Tabla 14.** Lista de las secuencias de DENV-1 obtenidas de los bancos genéticos e incluidas en el estudio.

Origen geográfico	Año	Cepa	Fuente de secuencia	Nº de accesión
Brasil	1990	DEN1BR/90	Genbank	AF226685
Singapur	1990	S275	Genbank	M87512
Venezuela	1998	BID-V-3543	Genbank	GU056031
Perú	2000	9615-00	Genbank	AF378170
Perú	2000	9581-00	Genbank	AF378169
Brasil	2001	BID-V2378	Genbank	FJ850073
Colombia	2001	BID-V3379	Genbank	GU131948
Venezuela	2004	BID-V2423	Genbank	JN819425
Nicaragua	2005	V1072	Genbank	EU482618
Singapur	2005	05K4147DK1	Genbank	EU081258
Ecuador	2006	RIVEEC91	Genbank	FJ464252
Venezuela	2006	Lima81	Genbank	FJ464316
Colombia	2007	BID-V3387	Genbank	GQ868567
Brasil	?	DF01-HUB01021093	Genbank	FJ384655

**Tabla 15.** Lista de las secuencias de DENV-2 obtenidas de los bancos genéticos e incluidas en el estudio.

<b>Origen geográfico</b>	<b>Año</b>	<b>Cepa</b>	<b>Fuente de secuencia</b>	<b>Nº de accesoión</b>
India	1960	23085	Genbank	AY293245
India	1974	742295	Genbank	AY593249
Tailandia	1974	ThD2_0038 74	Genbank	DQ181806
Colombia	1986	I348600	Genbank	AY702040
Tailandia	1993	ThNH-7/93	Genbank	AF022434
Tailandia	1993	ThNH-p36/93	Genbank	AF022441
Puerto Rico	1994	23DN	Genbank	GQ398274
Tailandia	1994	BID-V1458	Genbank	EU726767
Perú	1995	IQT-1950	Genbank	EU056811
Tailandia	1995	ThD2_0263_95	Genbank	DQ181800
Tailandia	1999	ThD2_0055_99	Genbank	DQ181798
Nicaragua	2001	BID-V2674	Genbank	FJ850121
R. Dominicana	2001	59/01	DBJ	AB122022
México	2002	BID-V2954	Genbank	GQ199893
Puerto Rico	2002	BID-V592	Genbank	EU482723
Puerto Rico	2005	BID-V1441	Genbank	EU687217
Puerto Rico	2007	BID-V1413	Genbank	EU596491
Brasil	2008	BID-V3637	Genbank	HM181971
Brasil	2008	BD-V3645	Genbank	GU131882

**Tabla 16.** Lista de las secuencias de DENV-3 obtenidas de los bancos genéticos e incluidas en el estudio.

<b>Origen geográfico</b>	<b>Año</b>	<b>Cepa</b>	<b>Fuente de secuencia</b>	<b>Nº de accesoión</b>
Pol. Francesa	1990	3050	Genbank	AY744679
Tailandia	1993	ThD3_0055	Genbank	AY676351
Tailandia	1994	C0360	Genbank	AY923865
Indonesia	1998	den3-98	Genbank	AY858039
Martinica	1999	1243	Genbank	AY099337
Martinica	2000	1567	Genbank	AY099338
Brasil	2002	BR74886	Genbank	AY679147
Perú	2002	BID-V2981	Genbank	FJ898458
Indonesia	2004	FW01	Genbank	AY858040
East Timor	2005	TL109NIID	DBJ	AB214881

**Tabla 17.** Lista de las secuencias de DENV-4 obtenidas de los bancos genéticos e incluidas en el estudio.

<b>Origen geográfico</b>	<b>Año</b>	<b>Cepa</b>	<b>Fuente de secuencia</b>	<b>Nº de accesoión</b>
Filipinas	1956	BID-V3361	Genbank	GQ868594
Brasil	1982	H402276	Genbank	JN559740
Colombia	1982	341750	Genbank	GU289913
Tailandia	1991	0348	Genbank	AY618990
Pto. Rico	1994	BID-V2430	Genbank	GQ199879
Pto. Rico	1996	BID-V2437	Genbank	GQ199883
Pto. Rico	1998	BID-V1094	Genbank	EU854297
Tailandia	2000	734	Genbank	AY618993
Tailandia	2001	0485	Genbank	AY618992
Colombia	2006	RIVE27COL	Genbank	FJ464259
Venezuela	2007	61027	Genbank	HQ332172
Venezuela	2007	BID-V1155	Genbank	GQ868644.
Perú	2008	FSL3667	Genbank	GQ139570
Perú	2008	FSL3686	Genbank	GQ139571
Perú	2008	IQE7335	Genbank	GQ139555
Venezuela	2008	BID-V2501	Genbank	FJ882592
Brasil	2010	Br246RR/10	Genbank	JN983813
China	2010	GZ30	Genbank	JQ822247
Perú	2010	1002aTw	Genbank	JF967780
Taiwan	?	2K0713	Genbank	AY776330



**Figura 14.** Flujograma para la identificación de los genotipos y linajes del DENV y el análisis filogenético de la unión de los genes E/NS1.

